

MESTRADO EM ENGENHARIA FARMACÊUTICA

**Desenvolvimento de um sistema de fluxo multi-impulsão para
determinação espectrofotométrica de norfloxacin e
ciprofloxacina em formulações farmacêuticas**



Faculdade de Farmácia
Universidade de Lisboa

Lisboa, 2010

Maria Helena Rocha Amorim

MESTRADO EM ENGENHARIA FARMACÊUTICA

Desenvolvimento de um sistema de fluxo multi-impulsão para determinação espectrofotométrica de norfloxacin e ciprofloxacina em formulações farmacêuticas

Trabalho de Dissertação apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Lisboa para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Farmacêutica

Orientação: Professor Doutor José Luís Fontes Costa Lima – FF.UP
Professor Doutor António José Leitão das Neves Almeida – FF.UL

Faculdade de Farmácia
Universidade de Lisboa
Lisboa, 2010

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Luís Fontes Costa Lima pela supervisão, orientação e inestimável apoio que foi prestado ao longo destes meses; acima de tudo por me ter ensinado a ler, escrever e contar.

Ao professor Doutor António José Neves Almeida pela orientação e valioso apoio.

À Doutora Karine Marques pelo apoio e disponibilidade no acompanhamento do trabalho laboratorial.

Ao Professor Doutor João Santos pela orientação prestada.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em particular o serviço de Química-Física.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e ao Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa.

Ao Jorge Manuel Ribeiro Miranda.

Ao Joaquim Amorim, Maria Emília Amorim, Gabriela Amorim, Manuel Alves. Ao António Rocha, Amélia Pereira, Gravelina Teixeira e António Dantas.

Ao Carlos Ribeiro, Miguel Lopes, Alida Queirós, Cláudia Carneiro, Maribel Esteves. Aos colegas do 1º Mestrado em Engenharia Farmacêutica e aos *Oblique Rain*.

Ainda: Lúcia Santos, Sofia Rodrigues, Jorge Sarraguça, Mafalda Sarraguça, Sara Oliveira, Carla Castro, Joana Ribeiro, Diana Gaspar, André Araújo, Cristina Silvestre, Paula Fortes, Eunice Rodrigues, Marieta Passos, Hugo Oliveira, Leonel Gaspar, Marisa Freitas, Rodrigo Santos, Ana Filipa Silva, Cláudia Pinho, David Ribeiro, Christian Frigerio, Warunya Boonjob, Nuno Faria, Ana Rita Reis, Ildiko Tóth, João Prior, Professor Doutor Rui Lapa.

RESUMO

No âmbito desta dissertação foi realizado um trabalho que visou o desenvolvimento de um sistema multi-impulsão para a determinação de ciprofloxacina e norfloxacin em formulações farmacêuticas.

A determinação baseou-se na reacção de N-bromosuccinimida com as fluorquinolonas, com formação de um composto cromogénico detectado espectrofotometricamente.

O método analítico proposto permitiu uma determinação rápida, fácil, versátil, com uma elevada frequência de amostragem, com diminuído consumo de amostras e reagentes e recorrendo a equipamento de baixo custo.

ABSTRACT

In this work a multi-pumping system was developed for the determination of norfloxacin and ciprofloxacin in pharmaceutical products.

The determination was based on the reaction between N-bromosuccinimide with the fluorquinolones, yielding a chromogenic compound which was detected spectrophotometrically.

The proposed analytical methodology allowed an easy, fast, versatile determination, with high throughput, reduced use of reagents and samples and also using low-cost equipment.

KEYWORDS

Multi-pumping – Multi-impulsão

Flow analysis – Análise em fluxo

Pulsed flow – Fluxo pulsado

Spectrophotometry – Espectrofotometria

Norfloxacin - Norfloxacin

Ciprofloxacin - Ciprofloxacin

Índice

1. Introdução	1
1.1. Enquadramento	2
1.2. Referências Bibliográficas	3
2. Variantes da Análise por Fluxo Não Segmentado como Métodos Automáticos de Análise	5
2.1. Métodos Automáticos de Análise	6
2.1.1. Conceitos Gerais	6
2.1.2. Métodos Automáticos Descontínuos	8
2.1.3. Métodos Robotizados	9
2.1.4. Métodos Automáticos Contínuos	9
2.1.5. Referências Bibliográficas	11
2.2. Análise por Injecção de Fluxo	13
2.2.1. Conceitos Gerais	13
2.2.2. Componentes e Modo de Funcionamento	16
2.2.3. Conclusões	17
2.2.4. Referências Bibliográficas	19
2.3. Análise por Injecção Sequencial	21
2.3.1. Conceitos Gerais	21
2.3.2. Componentes e Modo de Funcionamento	22
2.3.3. Conclusões	25
2.3.4. Referências Bibliográficas	26
2.4. Análise em Fluxo Multi-Comutado	27
2.4.1. Conceitos Gerais	27
2.4.2. Componentes e Modo de Funcionamento	27
2.4.3. Conclusões	31
2.4.4. Referências Bibliográficas	32
2.5. Análise em Fluxo por Multi-Seringa	34
2.5.1. Conceitos Gerais	34
2.5.2. Componentes e Modo de Funcionamento	35
2.5.3. Conclusões	36
2.5.4. Referências Bibliográficas	37
2.6. Análise em Fluxo em Sistemas de Interface Única	38
2.6.1. Conceitos Gerais	38
2.6.2. Componentes e Modo de Funcionamento	38
2.6.3. Conclusões	40
2.6.4. Referências Bibliográficas	40
2.7. Sistemas de Fluxo Multi-Impulsão	42
2.7.1. Antecedentes históricos.....	42
2.7.2. Conceitos Gerais	43
2.7.3. Componentes e Modo de Funcionamento das MB Solenóides	46

2.7.4. Dinâmica de Flúidos no Contexto da Multi-Impulsão	50
2.7.5. Aplicações e Implementação	53
2.7.6. Hifenização de Técnicas	56
2.7.7. Conclusões	56
2.7.8. Referências Bibliográficas	57
3. Fluorquinolonas	65
3.1. Indicações Terapêuticas e Mecanismo de Acção	66
3.2. Metodologias para a Determinação de Norfloxacin e Ciprofloxacina em Formulações Farmacêuticas.....	67
3.3. Referências Bibliográficas.....	69
4. Parte Experimental	74
4.1. Introdução	75
4.2. Reagentes e Soluções.....	75
4.3. Instrumentação	76
4.4. Componentes do Sistema de Fluxo Multi-Impulsão	77
4.5. Montagem de Fluxo	79
4.6. Optimização e Avaliação da Montagem de Fluxo.....	80
4.7. Metodologia de Referência	82
4.8. Referências Bibliográficas	83
5. Resultados e Discussão	85
5.1. Introdução	86
5.2. Optimização do Sistema de Fluxo	88
5.2.1. Estratégia de Amostragem e Volume de Amostra e Reagente	88
5.2.2. Dimensão do Reactor	90
5.2.3. Caudal	92
5.2.4. Concentração dos Reagentes	93
5.2.5. Temperatura	95
5.3. Parâmetros de Calibração do Sistema de Fluxo Multi-Impulsão	95
5.4. Estudo de Interferentes	96
5.5. Análise de Formulações Farmacêuticas	98
5.6. Referências Bibliográficas	101
6. Conclusões	103
6.1. Referências Bibliográficas	106

Índice de Figuras

Figura 2.1.1.1. Diagrama de um sistema de controlo	8
Figura 2.1.4.1. Representação esquemática de um sistema de fluxo segmentado	10
Figura 2.2.1.1. Representação esquemática de uma montagem FIA	13
Figura 2.2.1.2. Representação esquemática do transporte de um corante	14
Figura 2.2.1.3. Representação esquemática do perfil da amostra	14
Figura 2.2.1.4. Representação esquemática de fenómenos de difusão.....	15
Figura 2.2.2.1. Bomba peristáltica	16
Figura 2.2.2.2. Representação esquemática de uma montagem FIA mono-canal	17
Figura 2.2.2.3. Representação esquemática de uma montagem FIA por confluência	17
Figura 2.3.1.1. Válvula selectora usada em SIA	22
Figura 2.3.2.1. Representação esquemática de uma montagem SIA.....	22
Figura 2.3.2.2. Representação esquemática dos perfis de fluxo correspondentes a um ciclo analítico SIA.....	23
Figura 2.3.2.3. Sistema LOV.....	24
Figura 2.4.1.1. Representação esquemática do seccionamento de uma válvula solenóide	27
Figura 2.4.2.1. Representação esquemática de um sistema multi-comutado	29
Figura 2.4.2.2. Representação esquemática dos perfis de fluxo.....	30
Figura 2.5.1.1. Bureta automática e direcção dos fluidos quando movimentos pela acção do motor.....	34
Figura 2.5.2.1. Representação esquemática simplificada de um sistema multi-seringa	35
Figura 2.6.2.1. Representação esquemática de sistema de interface única envolvendo a utilização de quatro soluções	38
Figura 2.6.2.2. Representação esquemática da evolução do gradiente de concentração no tempo.....	39
Figura 2.7.2.1. Representação esquemática de uma montagem de fluxo multi-impulsão	44
Figura 2.7.2.2. Perfil analítico obtido pela inserção de um corante num sistema analítico multi-impulsão	45
Figura 2.7.3.1. Representação esquemática de uma micro-bomba solenóide da Bio-Chem Valve Inc	47
Figura 2.7.3.2. Micro-bomba solenóide Bio-Chem Valve Inc. Boston, USA	47
Figura 2.7.3.3. Representação esquemática de uma montagem de fluxo multi-impulsão	48
Figura 2.7.3.4. Representação esquemática de uma montagem de fluxo multi-impulsão para determinação de glucose e frutose em xaropes.....	49

Figura 2.7.3.5. Representação esquemática de uma montagem de fluxo multi-impulsão para determinação dos açúcares redutores totais.....	50
Figura 2.7.4.1. Representação esquemática de regimes de escoamento.....	52
Figura 3.1.1. Representação esquemática da estrutura da norfloxacin e ciprofloxacina	66
Figura 4.4.1. Micro-bomba solenóide da Bio-Chem Valve Inc	77
Figura 4.5.1. Representação esquemática da montagem analítica de fluxo multi-impulsão para determinação de norfloxacin e de ciprofloxacina em formulações farmacêuticas.....	79
Figura 5.1.1. Esquema representativo da proposta de produto reaccional obtido entre norfloxacin e NBS.....	87
Figura 5.2.1.1. Influência do número de pulsos introduzidos segundo a estratégia de amostragem binária	89
Figura 5.2.1.2. Influência do número de pulsos introduzidos segundo a estratégia de confluência de zonas	90
Figura 5.2.2.1. Influência do comprimento do reactor	91
Figura 5.2.3.1. Influência do caudal na intensidade do sinal analítico obtido para o produto reaccional da ciprofloxacina com NBS.....	93
Figura 5.2.4.1. Influência da concentração de NBS no perfil analítico obtido	94
Figura 5.3.1. Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração e análise de formulações farmacêuticas	96

Índice de Tabelas

Tabela 2.7.5 - Aplicações de sistemas multi-impulsão e características analíticas.....	54
Tabela 5.2.5 - Valores otimizados de parâmetros analíticos.....	95
Tabela 5.4 - Resultados obtidos no estudo de interferentes para a norfloxacin e para ciprofloxacina.....	97
Tabela 5.5A – Resultados da análise de formulações farmacêuticas contendo norfloxacin.....	99
Tabela 5.5B - Resultados da análise de formulações farmacêuticas contendo ciprofloxacina.....	100

CAPÍTULO 1 : INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Actualmente a cadência com que elementos de ruptura e de mudança se sucedem a nível científico, tecnológico, económico, cultural, político e social, exige uma maior celeridade e eficiência na obtenção de respostas aos problemas colocados nas vertentes anteriormente referidas assim como na comunicação da informação gerada.

Áreas tão díspares como a química, farmacêutica, alimentar, ambiental, clínica e biomédica são abrangidas não só pelos novos métodos e técnicas desenvolvidos, mas também pelas novas aplicabilidades desses métodos e técnicas na resolução de problemas analíticos [1].

Na avaliação das especificações de qualidade, a indústria farmacêutica recorre a análises químicas, físicas e físico-químicas, sendo um dos testes requeridos a determinação do teor em princípio activo. O controlo analítico deste parâmetro é fulcral no sentido de garantir compatibilidade entre a qualidade dos produtos farmacêuticos e as especificações determinadas por códigos oficiais, que regem todo o processo de desenvolvimento, fabrico e controlo de medicamentos.

A determinação do teor em princípio activo decorre da possibilidade de alteração química da substância activa durante o armazenamento, de um eventual erro de fabrico, de problemas com o transporte, entre outros.

As metodologias descritas nas farmacopeias usadas em controlo de qualidade, pese embora o facto de se terem estabelecido ao longo do tempo, apresentam contudo alguns aspectos menos favoráveis, como sejam o facto de requererem uma intervenção considerável do operador (afectando precisão e exactidão), o carácter laborioso de algumas intervenções (preparação e tratamento de amostras), um tempo de execução elevado e implicando muitas vezes o recurso a equipamento dispendioso [2-4].

Os métodos analíticos usados na determinação de teor em princípio activo devem ser selectivos, precisos, exactos e de preferência irem ao encontro das noções de economia de recursos e pessoal assim como garantirem um elevado ritmo de amostragem.

O princípio básico dos sistemas de fluxo é a introdução e processamento em condições reprodutíveis de uma amostra num percurso analítico essencialmente constituído por tubagens, havendo assim um confinamento da amostra num ambiente fechado, diminuindo o contacto com o exterior e consequentemente os riscos de contaminação [5].

O recurso a sistemas de fluxo não segmentado permite a obtenção de resultados reprodutíveis sem necessidade de se atingir um estado estacionário, uma maior eficiência de mistura entre amostra e reagente e um menor consumo de amostras e reagentes, relativamente ao método discreto (sistema descontínuo) [5,6].

As metodologias de fluxo baseadas em multi-impulsão na análise de produtos farmacêuticos, tema central desta dissertação, podem-se constituir como alternativas aos métodos mais comumente usados no controlo de rotina de qualidade descritos nas farmacopeias, no sentido de permitirem uma utilização de equipamento de baixo custo, de permitirem uma facilidade e versatilidade de operações com elevada frequência de amostragem e de diminuir o consumo de amostras e reagentes. Aliadas a estas características, encontram-se também as noções de inovação e de aplicabilidade a distintas situações analíticas com alterações mínimas a nível da montagem analítica e de programação de controlo do sistema [2-4].

1.2. Referências Bibliográficas

[1] ROUESSAC, Francis ; ROUESSAC, Annick - **Chemical Analysis : Modern Instrumentation Methods and Techniques**. John Wiley & Sons, LTD.

[2] LIMA, J. ; SÁ, S. ; SANTOS, J. ; ZAGATTO, E. – Multi-pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 32 (2003) 1011-1017.

- [3] MARQUES, K. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – A catalytic multi-pumping flow system for the determination of chemiluminometric determination of metformin. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**. 382 (2005) 452-457.
- [4] RIBEIRO, M. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. ; DIAS, A. ; ZAGATTO, E. – Fully automated spectrophotometric method for the determination of buspirone in pharmaceutical preparations. **Analytical Letters**. 39 (2006) 2243-2253.
- [5] ROCHA, F. ; REIS, B. ; ZAGATTO, E. ; LIMA, J. ; LAPA, R. ; SANTOS, J. - Multicommutation in flow analysis : concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**. 468 (2002) 119-131.
- [6] LAPA, R. ; LIMA, J. ; REIS, B. ; SANTOS, J. ; ZAGATTO, E. – A multicommutated flow system with on-line compensation of the Schlieren effect applied to the spectrophotometric determination of pindolol. **Analytica Chimica Acta**. 366 (1998) 209-215.

CAPÍTULO 2 : VARIANTES DA ANÁLISE POR FLUXO NÃO SEGMENTADO COMO MÉTODOS AUTOMÁTICOS DE ANÁLISE

2. Variantes da Análise por Fluxo Não Segmentado como Métodos Automáticos de Análise

2.1. Métodos Automáticos de Análise

2.1.1. Conceitos Gerais

Ao longo das últimas décadas tem-se registado uma tendência crescente para a diminuição da intervenção do operador nos procedimentos analíticos. Esse ideal de parcial ou total ausência de intervenção do operador foi sendo atingido através da incorporação de máquinas e instrumentação variada, em que os laboratórios de análise química se constituíram como um dos principais utilizadores [1].

Devido ao grande desenvolvimento da electrónica e da informática nas últimas décadas, registaram-se alterações significativas nas capacidades da instrumentação analítica, de que tem resultado um aumento da adopção dos métodos automáticos de análise. As vantagens dos métodos automáticos são primordialmente de índole económica (menor envolvimento do operador; operadores menos qualificados; menor consumo de amostras e reagentes), verificando-se também uma maior velocidade nas determinações e um aumento da precisão e da reprodutibilidade [2,3].

Uma determinação analítica realizada na modalidade discreta é constituída por várias operações unitárias nomeadamente, preparação da amostra, definição do volume de amostra, dissolução da amostra, separação, medição, calibração, tratamento de dados, apresentação de dados [3-5]. Num método totalmente automático todas as operações unitárias discriminadas são executadas sem intervenção humana, sendo possível inclusivamente obter informação de forma contínua, em tempo real, o que facilita o controlo dos processos. Pode ainda garantir uma maior eficiência energética e um menor impacto ambiental [6].

Associados ao conceito de automatização são frequentemente usadas de forma equívoca, expressões como sistemas automáticos e sistemas automatizados. No sentido de normalizar conceitos e de obviar usos incorrectos das expressões, a *International Union of Pure and Applied*

Chemistry (IUPAC) faz a distinção entre sistemas automáticos e automatizados.

Um dispositivo automático constitui-se como aquele que realiza acções programadas sem intervenção do operador. No entanto, como não tem incorporado um sistema de retro-alimentação, o seu funcionamento não é modificado em função do sinal analítico obtido.

Um dispositivo automatizado incorpora um ou vários sistemas de retro-alimentação que controlam o curso dos procedimentos em função do resultado de cada determinação [3].

Por exemplo, durante a execução operacional de um processo numa unidade fabril, há variáveis críticas que têm de ser monitorizadas e controladas de modo a garantir que as especificações de qualidade sejam cumpridas. As variáveis críticas de um processo estão conectadas com um sistema automático de alarme, que funciona como chamada aos operadores para uma situação que necessite de ajuste.

A introdução de controlo num sistema tem por objectivo obter uma operação de produção ao menor custo, aumentar a segurança do processo, garantir a qualidade dos produtos obtidos e garantir a obtenção das taxas de produção designadas à partida. Estes objectivos são atingidos através de uma combinação de controlo automático, monitorização manual e análises laboratoriais [7].

Um sistema de controlo depende de três componentes essenciais: (i) sensores – fontes de informação do processo; (ii) controladores – decisores no sentido de eliminar perturbações relativas ao *setpoint* estabelecido; (iii) actuadores – efectivadores da decisão do controlador.

O esquema apresentado na Figura 2.1.1.1 ilustra um tipo de controlo por *feedback* em que a variável de saída é controlada depois de ter ocorrido uma perturbação na variável de entrada. Este controlo é normalmente escolhido em detrimento de um controlo *feedforward* (que actua mediante informação recebida a nível da variável de entrada), na medida em que é menos oneroso, não necessita de modelos matemáticos e *softwares* complexos, tendo uma actuação abrangente a nível das variáveis manipuladas [7].

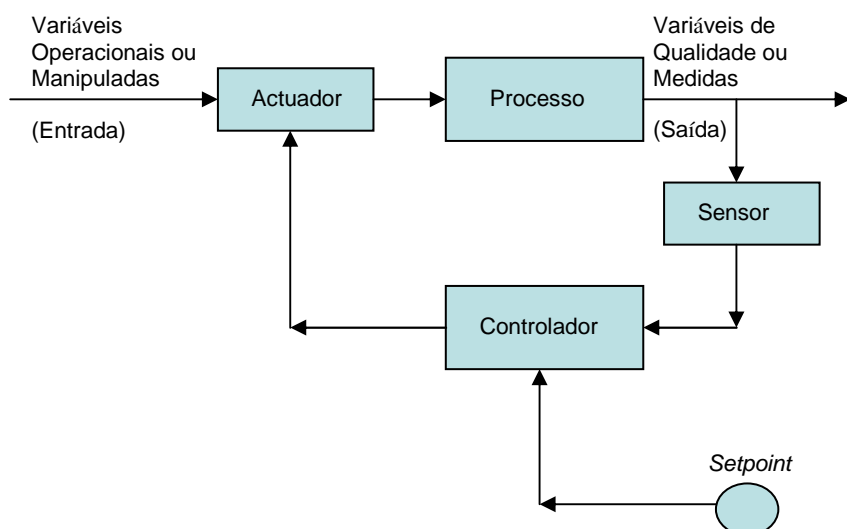


Figura 2.1.1.1. Diagrama de um sistema de controlo.

Devido à proliferação das metodologias analíticas, há tendência para as agrupar, o que torna difícil o estabelecimento de uma nomenclatura que possa ser aceite de forma generalizada. Neste trabalho, será seguida a proposta de Valcárcel *et al.*, que agrupam os métodos automáticos de análise segundo a metodologia usada no processamento da amostra. As três categorias propostas são: métodos automáticos descontínuos, métodos robotizados e métodos automáticos contínuos [8].

2.1.2. Métodos Automáticos Descontínuos

Nos métodos automáticos descontínuos, as amostras separadas em recipientes, são sujeitas a diferentes operações unitárias sequenciais como sejam adição de reagentes, diluições, *etc.*, havendo um encaminhamento mecânico final para um instrumento de detecção que fornece a medida da propriedade. Como resultado, é obtido um conjunto de sinais discretos em que cada um corresponde a uma amostra e onde a propriedade medida está directamente relacionada com a concentração da espécie a determinar [2].

De salientar a semelhança entre este procedimento automático e o método discreto.

2.1.3. Métodos Robotizados

Nos métodos robotizados recorre-se a mini-robots (normalmente braços mecânicos) controlados por microprocessadores (com funções de programação, ajuste durante o processo e registo de dados), realizando-se as operações com uma maior rapidez e eliminando erros associados ao operador [3].

Segundo o *Robot Institute of America*, um robot é um manipulador multi-função, reprogramável, capaz de movimentar objectos e de executar tarefas pré-programadas. É normalmente constituído por uma base fixa, um braço articulado, uma unidade de controlo e um dispositivo de programação, podendo ser accionado por ar comprimido, fluídos hidráulicos ou por motores eléctricos. Em 1958 George Devol construiu o primeiro protótipo de um robot e em 1961 o primeiro robot foi usado pela *General Motors* [1].

Como mais-valias há a considerar a sua estabilidade e eficiência, sendo essenciais para a realização de trabalhos maçadores e perigosos.

Devido ao elevado custo de investimento inicial, ao elevado custo de manutenção, ao tempo dispendido no desenvolvimento do *software* assim como na exigência de espaço e geometrias determinadas para a instalação de sistemas robotizados, verifica-se que actualmente as aplicações deste tipo de métodos estão restritas a apenas algumas operações, principalmente na indústria e nomeadamente na manipulação de compostos radioactivos [5].

2.1.4. Métodos Automáticos Contínuos

Uma análise designada em fluxo contínuo refere-se à medição da concentração de analito de uma forma ininterrupta, num fluxo líquido ou gasoso [4].

Nestes sistemas, as amostras são introduzidas em tubagem por onde passa um fluxo líquido que funciona como solução transportadora. A solução transportadora pode conter um reagente e outros reagentes podem também ser adicionados através de condutas auxiliares e de confluências. Nestas condições, estabelece-se uma zona de reacção que segue um determinado

percurso até um sistema de detecção, sistema esse que produz um sinal analítico relacionável com a grandeza que se visa determinar [4].

No sentido de prevenir o contacto entre diferentes amostras, Skeggs propôs em 1957 o designado método de fluxo contínuo segmentado (SFA - *Segmented Flow Analysis*) [4,6].

O primeiro sistema foi desenvolvido para a determinação de ureia e glucose no sangue, tendo-se o *AutoAnalyser* da Technicon tornado no mais popular analisador automático [4].

Neste método verifica-se uma segmentação das soluções, através da introdução de bolhas de ar, que separam amostras, padrões e os ensaios em branco e que devem ser eliminadas antes de atingirem o detector (Figura 2.1.4.1) [6].

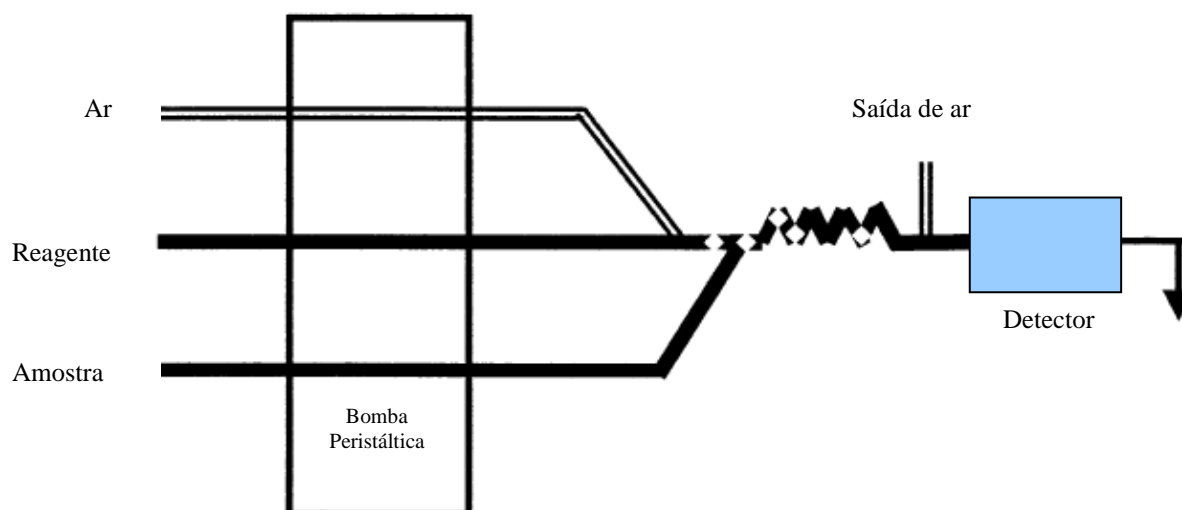


Figura 2.1.4.1. Representação esquemática de um sistema de fluxo segmentado. Adaptado de [12].

Relativamente ao método discreto, o método de fluxo contínuo segmentado, garante a possibilidade de reprodutibilidade do fenómeno de convecção e consequentemente assegura uma reprodutibilidade da mistura [5].

A introdução de bolhas de ar no sistema apresenta vantagens e desvantagens. Por um lado, evita a contaminação cruzada de amostras, impede uma elevada dispersão da amostra, facilita a geração de um fluxo turbulento responsável por uma mais eficiente homogeneização. Por outro lado, implica a eliminação das bolhas de ar antes de atingir o detector, diminui

a eficácia dos sistemas de separação, dificulta a aplicação dos métodos de paragem de fluxo e dificulta a miniaturização [4,6].

O sinal analítico obtido apresenta-se como quase rectangular, com um arredondamento dos vértices devido ao fenómeno de *carryover*. Este fenómeno tem origem numa película líquida residual de amostra e reagentes nas paredes da tubagem, facilitando uma contaminação [5].

Actualmente, são contudo os métodos de fluxo contínuo não-segmentado os que maior interesse despertam desde que em 1975, Ruzicka *et al.*, sugeriram pela primeira vez o conceito de análise por injeção de fluxo (FIA – *Flow Injection Analysis*).

Neste modo de gestão de fluídos, a introdução da amostra e reagentes faz-se predominantemente por injeção em detrimento da técnica de aspiração utilizada no método de fluxo contínuo segmentado [6]. A reprodutibilidade e exactidão da inserção de amostras e reagentes (controlo do nível de dispersão) origina um sinal discreto, não havendo necessidade de se atingir o estado estacionário quer a nível químico, quer a nível de mistura [9,10].

Com o aparecimento do FIA, foi possível tornar as determinações mais rápidas, tendo sido igualmente possível o surgimento e desenvolvimento de procedimentos como por exemplo, a medição de constituintes com tempos de semi-vida pequenos [10].

Depois do aparecimento do FIA, novos métodos foram desenvolvidos, nomeadamente a análise por injeção sequencial (SIA – *Sequential Injection Analysis*), a análise por fluxo multi-comutado (MCFIA – *Multi-Commutation Flow Injection Analysis*), a análise por fluxo multi-seringa (MSFIA – *Multisyringe Flow Injection Analysis*), a análise por fluxo multi-impulsão (MPFS – *Multi-Pumping Flow System*) e a análise em sistema de fluxo de interface única (SIFA – *Single Interface Flow Analysis*), que serão referidos em pormenor nos capítulos posteriores [6,11,12].

2.1.5. Referências Bibliográficas

[1] MARTÍNEZ Calatayud, José - **Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals : Automation in the Laboratory**. Taylor & Francis, 1996.

- [2] RUZICKA, Jaromir ; HANSEN, Elo - Flow Injection Analysis. 1. New concept of fast continuous-flow analysis. **Analytica Chimica Acta**. 78 (1975) 145-157.
- [3] SKOOG, Douglas ; HOLLER, F ; NIEMAN, Timothy - **Principios de Análisis Instrumental**. McGraw-Hill, Quinta Ed.
- [4] RUZICKA, Jaromir ; HANSEN, Elo - **Flow Injection Analysis**. 2^a Ed., 1988.
- [5] KARLBERG, Bo ; PACEY, Gil - **Flow Injection Analysis : a Practical Guide**. 1989.
- [6] CERDÀ, Victor - **Introducción a los métodos de análisis en flujo**. Palma de Maiorca: Ed. Sciware, 2006.
- [7] COULSON, JM. ; RICHARDSON, JF. - **Tecnologia Química**. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1985.
- [8] VALCÁRCEL, Miguel - **Flow Injection Analysis : Principles and Applications**. New York : John Wiley and Sons, 1987.
- [9] RUZICKA, Jaromir ; HANSEN, Elo - Flow Injection Analysis : Part X. Theory, Techniques and Trends. **Analytica Chimica Acta**. 99 (1978) 37-76.
- [10] HANSEN, Elo - 30 Years of flow injection analysis : And passing the torch. **Analytica Chimica Acta**. 600 (2007) 4-5.
- [11] BARNETT, N. ; LENEHAN, C. ; LEWIS, S. - Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**. 18 (1999) 346-353.
- [12] CERDÀ, V. ; ESTELA, J. ; FORTEZA, R. ; CLADERA, A. ; BECERRA, E. ; ALTIMIRA, P. ; SITJAR, P. - Flow techniques in water analysis. **Talanta**. 50 (1999) 695-705.

2.2. Análise por Injecção de Fluxo

2.2.1. Conceitos Gerais

A técnica FIA apareceu referida pela primeira vez na literatura em 1975 por Jaromir Ruzicka e Elo Hansen, constituindo-se como uma alternativa vantajosa aos métodos de fluxo contínuo segmentado [1].

Baseia-se na medida de um sinal transiente (registado de forma contínua) obtido por injecção de um segmento de amostra num fluxo transportador não segmentado em movimento contínuo. A amostra pode reagir com o transportador, dispersar-se nele ou ainda reagir com outros fluídos que sejam adicionados por confluências ao canal principal (Figura 2.2.1.1) [1,2].

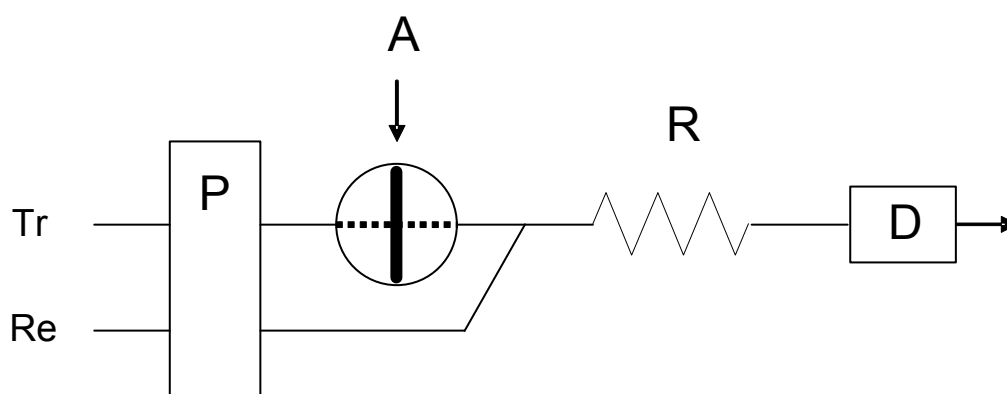


Figura 2.2.1.1. Representação esquemática de uma montagem FIA em que o volume de amostra injectado é definido pela dimensão da alça (*loop*) do dispositivo de injecção (válvula rotativa). Tr: Transportador; Re: reagente; P: Bomba Peristáltica; A: Amostra; R: Reactor; D: detector.

Ruzicka e Hansen reconhecem três princípios básicos inerentes a um sistema FIA [3]: (i) injecção da amostra em fluxo contínuo; (ii) tempo de permanência do segmento de amostra na tubagem reprodutível; (iii) dispersão controlada da amostra.

O segmento de amostra que percorre a tubagem apresenta o perfil parabólico de concentrações característico de um escoamento laminar de fluídos Newtonianos ($Re < 2100$, sendo Re o número adimensional de Reynolds que é traduzido pela equação $Re = \rho v D / \mu$ em que ρ – densidade; v –

velocidade de referência; D – dimensão de referência; μ - viscosidade) (Figura 2.2.1.2) [4,5].

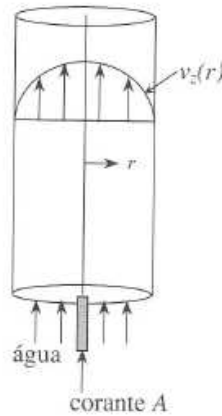


Figura 2.2.1.2. Representação esquemática do transporte de um corante em regime laminar. $V_z(r)$ – Velocidade média axial [5].

Se no instante imediato à injeção se forma uma zona de amostra de perfil cilíndrico, em consequência dos processos de transporte por convecção (condicionado pela dimensão da tubagem) e de difusão (radial e axial), ocorrerá durante o transporte um alargamento da zona de amostragem, com progressiva formação de um perfil parabólico tal como se ilustra na Figura 2.2.1.3 [4].

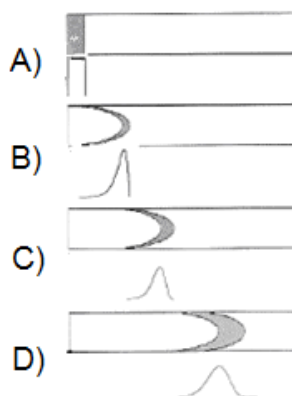


Figura 2.2.1.3. Representação esquemática do perfil da amostra em função do espaço percorrido. A) Momento da injeção; B) Predomínio da convecção; C) Convecção-difusão; D) Predomínio da difusão [6].

Ao longo do percurso entre a injeção da amostra e o detector, é possível tipificar que numa fase inicial predomina o transporte por convecção em que se obtém um perfil parabólico devido ao facto de as moléculas junto à parede da tubagem apresentarem uma velocidade virtualmente nula e as moléculas que se movem no centro da tubagem apresentarem uma velocidade que corresponde ao dobro da velocidade média.

O transporte por difusão verifica-se devido à formação de gradientes de concentração durante o transporte e compreende a difusão radial e axial [4]. A difusão radial em particular é a principal contribuidora para uma eficiente mistura entre amostra e reagente ao mesmo tempo que preserva a identidade da amostra por ter um efeito contrário à dispersão por convecção (Figura 2.2.1.4) [4].

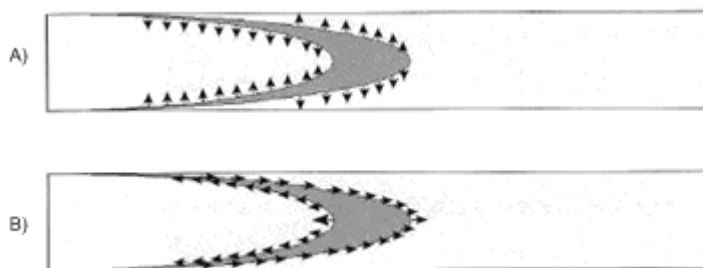


Figura 2.2.1.4. Representação esquemática de fenómenos de difusão devido a um gradiente de concentrações : A) difusão radial; B) difusão axial [6].

A dispersão corresponde ao grau de diluição que a amostra sofre durante o processo de transporte e é definida pela equação $D = C_0 / C$, em que C_0 corresponde à concentração de analito na amostra injectada e C corresponde à concentração da espécie no segmento da amostra ao atingir o detector [4].

Através da mudança de certos parâmetros, nomeadamente o volume de amostra, a dimensão e diâmetros da tubagem e reactores, o tempo de residência (que pode ser manipulável através do método de paragem de fluxo, da alteração do caudal e da alteração das dimensões de um reactor) e o volume da célula de detecção, é possível controlar a dispersão física do segmento de amostra e controlar o desenvolvimento da reacção química. Adequam-se assim os parâmetros aos requisitos de um determinado

procedimento analítico, de modo a obter-se uma resposta óptima no menor tempo e com o menor consumo de reagentes possível [3,4].

Se a extensão da dispersão, o tempo de reacção e os parâmetros físicos do sistema forem constantes durante o processo, é possível tornar as determinações analíticas reprodutíveis [6].

2.2.2. Componentes e Modo de Funcionamento

Um sistema FIA pode compreender um dispositivo de propulsão como uma bomba peristáltica (Figura 2.2.2.1), que permite o ajuste de caudais e dentro de certos limites garante a reprodutibilidade dos mesmos; um dispositivo de injeção (uso de seringas, válvulas *flap*, válvulas rotatórias e válvulas de duas posições operadas manualmente); um ou mais pontos de confluência (que permitem a adição de reagentes); tubagem que permita a dispersão/reacção da amostra; um detector que monitorize a espécie a determinar e um registador [3,7].



Figura 2.2.2.1. Exemplo do dispositivo de propulsão mais comumente usado em FIA, uma bomba peristáltica.

Os sistemas FIA podem apresentar diversas configurações, sendo a mais simples, a designada por montagem mono-canal ou de um só canal (Figura 2.2.2.2) [8]. Numa situação em que é utilizada a detecção espectrofotométrica de um composto, o transportador tem a principal função de dispersar a

amostra, devendo-se encontrar uma situação de compromisso na dimensão da tubagem, entre melhoria das condições de mistura e aumento em excesso da dispersão com diminuição da sensibilidade [6].

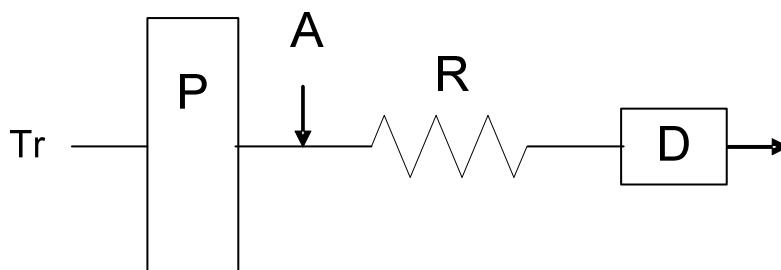


Figura 2.2.2.2. Representação esquemática de uma montagem FIA mono-canal. Tr: transportador; P: dispositivo de propulsão; A: amostra; R: reactor; D: detector.

Uma outra configuração típica de FIA é a configuração por confluência, em que esta existe de modo a permitir a adição de reagente (Figura 2.2.2.3) [6].

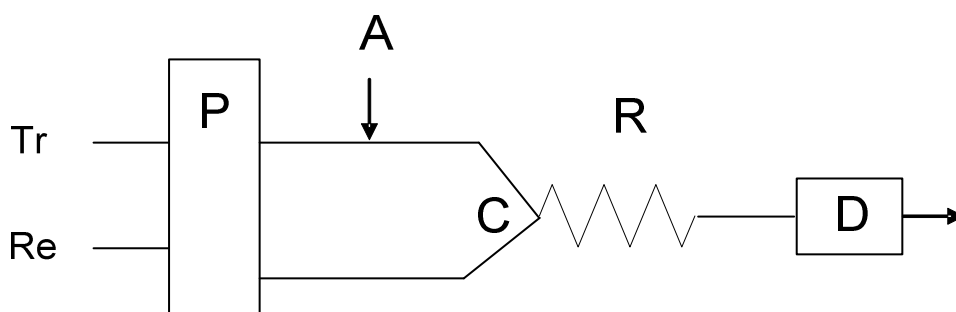


Figura 2.2.2.3. Representação esquemática de uma montagem FIA por confluência. Tr: transportador; P: dispositivo de propulsão; A: amostra; R: reactor; D: detector; Re: reagente; C: ponto de confluência.

2.2.3. Conclusões

A análise por injeção de fluxo permite (relativamente à análise em fluxo segmentado) a aplicação de metodologias analíticas tais como os métodos cinéticos, enzimáticos e de paragem de fluxo, que seriam mais complexos de implementar num sistema de fluxo segmentado com bolhas de ar [2]. Com a

eliminação da introdução de bolhas de ar no sistema e consequentemente da necessidade da sua eliminação antes da detecção, diminuíram-se as exigências de equipamento com um salto considerável no potencial de miniaturização [2,9]. A elevada reprodutibilidade, a elevada frequência de análise, o equipamento simples (corrente nos laboratórios) e não oneroso assim como o baixo consumo de amostra e reagentes relativamente ao método contínuo segmentado, garantiram a facilidade de implementação e expansão de FIA como processo automático nos laboratórios de análise.

De uma maneira geral, é possível com os sistemas FIA, executar ensaios com o recurso à bioluminescência e à quimioluminescência, aos estudos cinéticos de reacções químicas, à utilização de constituintes meta-estáveis, ao uso de intermediários de tempo de semi-vida baixo, aos estudos enzimáticos, aos estudos com paragem de fluxo, à determinação de metais propensos à formação de hidretos ou ainda a possibilidade de executar pré-tratamentos da amostra *on-line* [2,9,10]. Acrescente-se, a adição de virtualmente qualquer número de confluências para adição de reagentes assim como o facto de praticamente qualquer tipo de detector poder ser usado [2].

As desvantagens de FIA relativamente a metodologias mais recentes passam pelo potencial uso excessivo de reagentes assim como pela rápida alteração e degradação das tubagens usadas com a bomba peristáltica, que corresponde ao processo de impulsão mais usado [2].

Numa análise multicomponente (determinação de vários componentes), a configuração do sistema pode tornar-se muito complexa com prejuízo a nível da robustez das montagens, originando uma necessidade de manutenção muito elevada [11].

Os mais de 30 anos da metodologia FIA permitiram que se tornasse numa técnica de gestão de fluídos com uma aplicabilidade laboratorial e ambiental muito abrangente. A sua importância também se fez sentir no ramo industrial, nomeadamente na monitorização e controlo de processos [11].

2.2.4. Referências Bibliográficas:

- [1] RUZICKA, Jaromir ; HANSEN, Elo - Flow Injection Analysis. 1. New concept of fast continuous-flow analysis. **Analytica Chimica Acta**. 78 (1975) 145-157.
- [2] HANSEN, Elo ; WANG, J. - The three generations of flow injection analysis. **Analytical Letters**. 37 (2004) 345-359.
- [3] RUZICKA, Jaromir ; HANSEN, Elo - Flow Injection Analysis : Part X. Theory, techniques and trends. **Analytica Chimica Acta**. 99 (1978) 37-76.
- [4] SKOOG, Douglas ; HOLLER, F ; NIEMAN, Timothy - **Principios de Análisis Instrumental**. McGraw-Hill, Quinta Ed.
- [5] PINHO, Maria Norberta ; PRAZERES, Duarte Miguel - **Fundamentos de transferência de massa**. Lisboa: IST Press, 2008.
- [6] CERDÀ, Victor - **Introducción a los métodos de análisis en flujo**. Palma de Maiorca: Ed. Sciware, 2006.
- [7] RUZICKA, Jaromir ; HANSEN, Elo - Retro-review of flow-injection analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. 27 (2008) 390-393.
- [8] KARLBERG, Bo ; PACEY, Gil - **Flow Injection Analysis : a Practical Guide**. 1989.
- [9] HANSEN, Elo - 30 Years of flow injection analysis – and passing the torch. **Analytica Chimica Acta**. 600 (2007) 4-5.
- [10] HANSEN, Elo ; MIRÓ, Manuel - How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. 26 (2007) 18-26.

[11] BARNETT, N. ; LENEHAN, C. ; LEWIS, S. - Sequential injection analysis : an alternative approach to process analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**. 18 (1999) 346-353.

2.3. Análise por Injecção Sequencial

2.3.1. Conceitos Gerais

A técnica de análise por injecção sequencial (SIA – *Sequential Injection Analysis*) apareceu referida pela primeira vez na literatura em 1990 por Ruzicka e Marshall, constituindo-se como uma alternativa à metodologia FIA, viabilizada pela maior acessibilidade ao material informático no início da década de 90 [1].

A metodologia surgiu devido à crescente necessidade de maior versatilidade, flexibilidade, robustez, baixa manutenção, menor consumo de reagentes e que permitisse uma fácil reconfiguração do sistema, nomeadamente perante procedimentos automatizados complexos [1,2].

A metodologia mantém os princípios inerentes ao FIA, como a precisão na introdução da amostra, controlo de dispersão e reprodutibilidade, surgindo agora o computador como elemento ordenante do sistema.

Enquanto que a metodologia SIA se baseia num fluxo descontínuo, bi-direccional e programável com auxílio de um computador, a metodologia FIA emprega principalmente um sistema de propulsão uni-direccional contínuo (embora deva ser contemplada a existência de FIA com inversão de fluxo) [3].

Os componentes básicos usados por FIA e SIA são semelhantes, no entanto SIA é mecanicamente mais simples na medida em que recorre apenas a uma bomba, uma válvula e um canal único [4].

A válvula selectora de fluídos multiposição permite a adição sequencial da amostra e dos reagentes (Figura 2.3.1.1), possuindo uma porta central com ligação a várias portas laterais, através das quais se efectua a aspiração de soluções, o acoplamento de dispositivos adicionais e o descarte de soluções. A porta central encontra-se ainda ligada a um dispositivo de propulsão através de um tubo reactor de armazenamento [1].

O sistema é comandado por um computador que realiza a sincronização do dispositivo de propulsão com a válvula selectora e selecciona a conexão entre a porta central da válvula e as portas laterais. Define também para o dispositivo de propulsão o caudal, o volume e o sentido de fluxo das soluções [1].



Figura 2.3.1.1. Válvula selectora usada em SIA.

2.3.2. Componentes e Modo de Funcionamento

Neste método a amostra e os reagentes são aspirados sequencialmente para um tubo reactor de armazenamento através da comutação da válvula selectora multi-posição. Posteriormente através da inversão do sentido de rotação do dispositivo de propulsão (geralmente uma bomba peristáltica), é inserido um volume de solução transportadora que garanta o transporte da amostra até ao detector. Durante esse transporte verifica-se uma sobreposição reproduzível das zonas constituídas pela amostra e reagente (Figura 2.3.2.1 e Figura 2.3.2.2) [3,5].

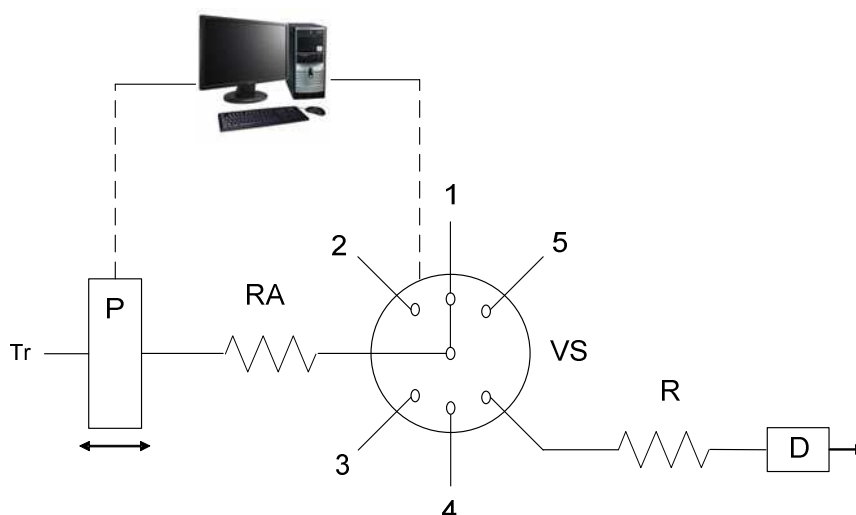


Figura 2.3.2.1. Representação esquemática de uma montagem SIA. Tr: transportador; P: sistema de propulsão; RA: reactor de armazenamento; R: reactor; D: detector; VS: válvula selectora; 1: amostra; 2: reagente; 3: solução transportadora; 4: esgoto; 5: aplicação de outros dispositivos.

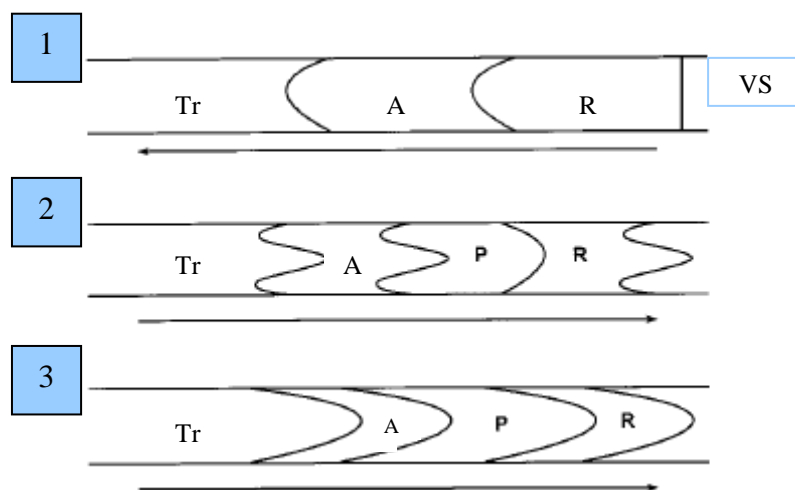


Figura 2.3.2.2. Representação esquemática dos perfis de fluxo correspondentes a um ciclo analítico SIA. 1 – Aspiração sequencial; 2 – Imediatamente a seguir à inversão do sentido do fluxo; 3 – No reactor. Tr: Transportador; A: Amostra; R: Reagente; VS: Válvula Selectora; P: Produto.

Com o advento da metodologia SIA, uma metodologia baseada em fluxo programável, começaram a ser desenvolvidas outras técnicas e metodologias no sentido de alargar o espectro e capacidade a nível das opções de análise química, nomeadamente a versão miniaturizada de SIA que surgiu em 2000, sob a designação de LOV (*Lab-on-valve*) (Figura 2.3.2.3) [6]. Um micro-circuito (CSPU - *Central Sample Processing Unit*) é constituído por tubagem e uma célula de fluxo (fibras ópticas configuráveis para os modos de absorvância ou fluorescência) e é colocado justaposto a uma válvula selectora, garantindo uma proximidade entre a porta de injeção e a célula de fluxo e uma maior flexibilidade no processamento da amostra.

Os sistemas são desenhados de modo a comportarem além da detecção, as mais diversas manipulações de amostra como diluições, adição de reagentes, mistura, separação e incubação [6].

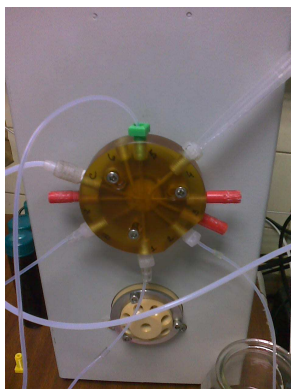


Figura 2.3.2.3. Sistema LOV.

Operando na gama dos microlitros, a técnica LOV utiliza tubagens de elevado diâmetro e comprimento restrito (relativamente ao normalmente usado em fluxo), garantindo com isso a minimização de adsorção e *carryover* devido a um aumento da razão volume/superfície [5].

Precisamente devido às características de diâmetro e comprimento da tubagem usada no sistema LOV, foi possível o surgimento da técnica BI (*Bead Injection*), onde microesferas são injectadas e confinadas na célula de fluxo. Após a injeção e a perfusão da amostra, esta reage com grupos funcionais da superfície das microesferas. As moléculas de analito retidas são detectadas na sua forma nativa ou depois de reagirem com compostos que confirmam cor ou fluorescência [5]. Esta técnica permite a obtenção de uma elevada precisão, da obviação do fenómeno de *carryover*, assim como uma rápida substituição da fase sólida reactiva (microesferas) [5].

Uma outra variante de SIA que surgiu foi a cromatografia por injeção sequencial (SIC – *Sequential Injection Chromatography*), baseada numa coluna monolítica que é intercalada entre a válvula e a célula de fluxo [5].

Com o aparecimento de SIC, foi possível realizar uma série de tarefas utilizando o mesmo instrumento, como sejam a realização de separações cromatográficas, ensaios enzimáticos, ensaios em série, acoplamento a métodos ópticos assim como a opção pela monitorização contínua [5].

2.3.3. Conclusões

Comparando SIA com FIA, esta última metodologia permite mais facilmente a monitorização *in-line* quando há uma necessidade de um fluxo contínuo durante um elevado período de tempo. A metodologia SIA apresenta por sua vez uma maior versatilidade, devido à possibilidade de se recorrer a um maior número de reagentes (há válvulas selectores com mais de 20 portas), devido a uma mais eficiente utilização das soluções, registando-se ainda um reduzido consumo de amostra e reagentes, com parca geração de resíduos. É ainda de salientar o facto de em SIA, não se necessitar de se efectuar reconfigurações físicas do sistema, bastando alterar para esse efeito o programa informático utilizado [5].

As desvantagens do SIA prendem-se com um menor ritmo de amostragem porque há um aumento do tempo requerido para determinada análise, aumento esse que depende principalmente do tempo dispendido na aspiração sequencial das diferentes soluções e na rotação da válvula entre as diversas portas. Registe-se ainda limitações no que concerne à extensão da sobreposição dos segmentos de amostra e de reagente (os segmentos de amostra e reagente encontram-se “topo a topo” não permitindo uma mistura tão eficiente como em FIA) [2].

Devido a um conjunto particular de vantagens de SIA relativamente a FIA, como a sincronização da bomba propulsora e da válvula selectora e a possibilidade de realizar um conjunto elevado de reacções e procedimentos químicos sem reconfiguração física do sistema, a perspectiva da monitorização de um processo tornou-se mais atractiva [7].

As principais áreas de aplicação no campo industrial prendem-se com a monitorização de bioprocessos (nomeadamente controlo de processos fermentativos), análise de águas residuais, monitorização de processos farmacêuticos e ainda aplicações na indústria nuclear e de petróleos [7].

2.3.4. Referências Bibliográficas

- [1] RUZICKA, Jaromir ; MARSHALL, G. - Sequential Injection : A new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**. 237 (1990) 329-343.
- [2] CERDÀ, Victor - **Introducción a los métodos de análisis en flujo**. Palma de Maiorca: Ed. Sciware, 2006.
- [3] HANSEN, Elo ; WANG, J. - The three generations of flow injection analysis. **Analytical Letters**. 37 (2004) 345-359.
- [4] TALJAARD, R ; STADEN, J. - Application of sequential-injection analysis as process analyzers. **Laboratory Robotics and Automation**. 10 (1998) 325-337.
- [5] SOLICH, P. ; POLASEK, M. ; KLIMUNDOVA J. ; RUZICKA, J. - Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. 22 (2003) 116-126.
- [6] RUZICKA, J. - Lab-on-valve : Universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. **The Analyst**. 125 (2000) 1053-1060.
- [7] BARNETT, N. ; LENEHAN, C. ; LEWIS, S. - Sequential injection analysis : an alternative approach to process analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**. 18 (1999) 346-353.

2.4. Análise em Fluxo Multi-Comutado

2.4.1. Conceitos Gerais

A técnica de análise em fluxo multi-comutado (MCFA – *Multi-Commutation Flow Analysis*) apareceu referida pela primeira vez na literatura em 1994 por Reis *et al.* [1]. Compreende a existência de dispositivos de comutação que inserem e permutam as soluções com modo de actuação independente e com controlo por computador (vulgarmente válvulas solenóides como ilustrado na Figura 2.4.1.1).



Figura 2.4.1.1. Representação esquemática do seccionamento de uma válvula solenóide [2].

O conceito de comutação surgiu como uma possibilidade de aumento da versatilidade dos sistemas, tendo sido possível explorar de uma maneira muito mais simples procedimentos como a paragem de fluxo, a possibilidade de acesso aleatório e direccionamento selectivo de amostras, reagentes e soluções transportadoras [3,4].

Pode considerar-se um sistema multi-comutado como uma rede analítica que envolve a actuação de n dispositivos ou de n operações em determinada amostra com estabelecimento de 2^n estados. O processamento da amostra é definido por um *software* de controlo [4].

2.4.2. Componentes e Modo de Funcionamento

O dispositivo de comutação mais frequentemente usado nesta metodologia é a válvula solenóide, que é um dispositivo que permite ou impede

a passagem de um fluido através de um diafragma. Este diafragma é activado por um solenóide (fio condutor de corrente eléctrica enrolado em hélice) que quando percorrido por uma corrente eléctrica contínua, altera o estado da válvula.

Existem válvulas com duas e três vias, em que o fluxo é comutado na posição aberta (ON) ou fechada (OFF). Com duas vias, o fluido passa ou não passa; com três vias, duas das três portas estão conectadas e quando é aplicada uma diferença de potencial à válvula, verifica-se uma mudança entre a conectividade das portas.

Antes de serem usadas nesta aplicação, as válvulas solenóides já estavam disseminadas pelos laboratórios, nomeadamente com uso em dispositivos cromatográficos, em espectrometria de massa e ainda em determinações dos índices de refração [4]. Segundo Cerdà, foi resultante da tentativa de integrar estes dispositivos nas montagens FIA e SIA, que surgiu a multi-comutação [5,6].

Pode verificar-se uma alteração e deformação dos componentes em teflon® das válvulas solenóides quando estas são sujeitas a longos períodos de funcionamento, devido ao calor dissipado (sobreaquecimento). Esta situação conduz a uma menor reprodutibilidade de actuação e consequentemente leva a considerar a válvula solenóide como um elemento destituído de uma elevada robustez [6]. Por exemplo, para a realização de trabalhos específicos em que a elevada reprodutibilidade é uma questão fulcral, há a possibilidade de recurso a dispositivos mais fiáveis e reprodutíveis como por exemplo uma válvula accionada por pressão de gás [7,8]. Como tentativas de resolução do problema de sobreaquecimento do solenóide, criou-se um sistema de protecção electrónica que ao não cessar e apenas baixar a corrente que passa pelo solenóide para níveis muito baixos, limita o potencial de sobreaquecimento (circuito CoolDrive™) [6,9].

Tal como em outros sistemas de fluxo, a propulsão das soluções (por impulsão ou aspiração) é realizada por intermédio de uma bomba peristáltica, de uma bureta de pistão ou ainda de uma micro-bomba solenóide.

Se numa fase inicial da implementação do sistema de multi-comutação, se recorreu exclusivamente ao posicionamento dos sistemas de aspiração após o detector (Figura 2.4.2.1), actualmente essa situação sofreu alguma alteração,

com recurso a opções de propulsão em que ocorrem pressões positivas no interior do sistema.

O modo de aspiração, devido à pressão no interior do sistema ser inferior à pressão atmosférica, favorece o aparecimento de bolhas de ar com eventual comprometimento da reprodutibilidade dos resultados obtidos. Apresenta no entanto vantagens de ordem económica (um único dispositivo de aspiração) [10].

A impulsão das soluções (dispositivo antes das válvulas solenóides) obvia o constrangimento que pode ser causado pelas bolhas de ar no sistema [10].

As distintas configurações mais vulgarmente usadas até ao momento, passam pelo estabelecimento de uma configuração linear, circular ou em estrela, podendo ser implementados diferentes procedimentos de processamento e manipulação da amostra como sejam o controlo de diluições, determinações sequenciais, aumento do tempo de residência, pré-concentração, separação, podendo-se referir ainda a possibilidade de se realizarem titulações [4]. Pode surgir assim facilmente a noção de uma rede de fluxo com elevada versatilidade metodológica sem necessidade de reconfiguração física do sistema.

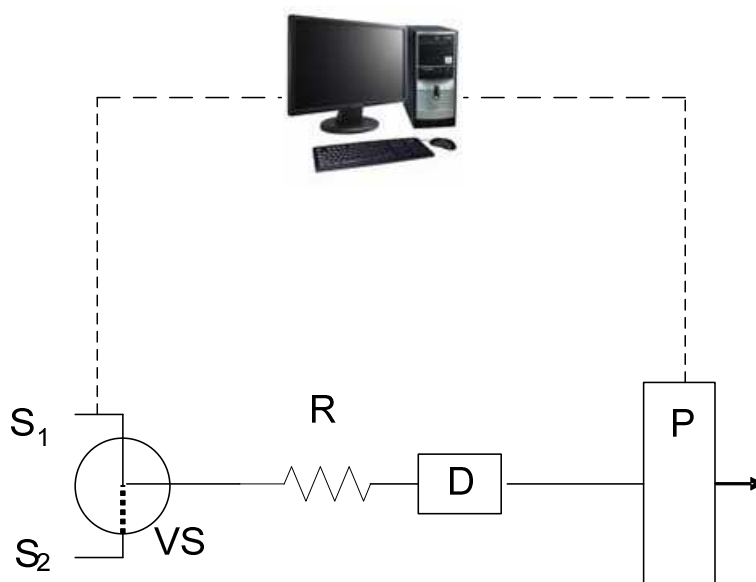


Figura 2.4.2.1. Representação esquemática de um sistema multi-comutado com recurso a uma válvula solenóide de duas vias. S1 e S2: soluções; VS: válvula solenóide; R: reator; D: detector; P: bomba peristáltica. Adaptado de [4].

A válvula solenóide, pela sua característica de grande rapidez de comutação, confere vantagens importantes relativamente a outros dispositivos de injeção no que concerne à forma de inserção de amostra e reagente. Com base num controlo temporizado, pequenas alíquotas de amostra são intercaladas com pequenas alíquotas de reagente (amostragem binária), favorecendo uma mais rápida e eficiente homogeneização e mistura durante o transporte. Para um volume total constante de amostras e reagentes, proporciona-se uma mais eficiente mistura por diminuição dos volumes de alíquotas e por aumento do número de fracções de alíquotas. A inserção de n pares de alíquotas permite a formação de $2n-1$ interfaces, sujeitas a dispersão axial (Figura 2.4.2.2) [4].

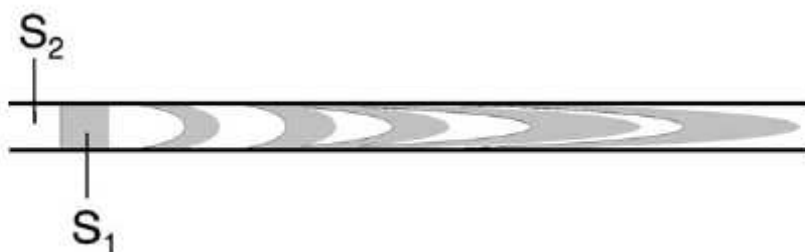


Figura 2.4.2.2. Representação esquemática dos perfis de fluxo estabelecidos durante o transporte. S₁: solução um; S₂: solução dois [4].

Os volumes introduzidos das soluções são agora função dos tempos de actuação (activação/desactivação) das válvulas solenóides, da velocidade de comutação e do caudal estipulado. Relativamente à metodologia FIA já abordada, pode-se agora falar em tempo de inserção em detrimento de volume de inserção [10].

Uma rápida comutação da válvula entre dois canais pode permitir que à saída das válvulas solenóides os fluídos se apresentem praticamente misturados, dispensando o processo de transporte para efeitos de mistura, obtendo-se consequentemente uma menor dispersão e uma maior velocidade de formação de produto com aumento do ritmo de amostragem [1].

Uma das vantagens da implementação da amostragem binária prende-se com a minimização das diferenças no índice de refracção das interfaces das soluções nas medições espectrofotométricas [4,10].

Para ilustrar o baixo consumo de reagentes da metodologia de análise em fluxo multi-comutado, refira-se o trabalho desenvolvido por Reis *et al.* [11] que consiste na determinação do pesticida carbaryl em que as figuras de mérito encontradas foram directamente comparadas com FIA e SIA e em que se verificou uma diminuição de volume de reagente usado (uso de 0,14 mg de *p*-aminofenol que passou a 5 µg) assim como uma diminuição de resíduos gerados.

2.4.3. Conclusões

Devido à possibilidade de controlo electrónico e à versatilidade das montagens dos sistemas multi-comutados, é possível explorar todo um conjunto de procedimentos, de processamento de amostra e de introdução de soluções no sistema, de modo a dar resposta a novos problemas analíticos ou mesmo a melhorar o desempenho de técnicas analíticas já implementadas [9].

Através de uma dispersão controlada mais eficientemente, é possível uma implementação mais fácil de estratégias que impliquem a formação de gradientes como a paragem de fluxo assim como a possibilidade de determinações multi-paramétricas [9].

A multi-comutação recorre a equipamento económico, de fácil implementação e com um bom potencial de miniaturização para análises de campo, sendo a análise ambiental a maior área de aplicação [12].

O consumo de amostras e reagentes é bastante diminuto assim como a geração de resíduos, daí a importância desta técnica para uma implementação cada vez mais sólida e significativa do conceito de Química Verde [12].

As desvantagens relacionadas com este método prendem-se com a necessidade de sincronização entre os dispositivos de propulsão e as micro-inserções de soluções assim como o facto de não se encontrarem comercialmente disponíveis muitas alternativas de equipamento de controlo das válvulas solenóides, obrigando à criação de *software* específico [9].

Em termos de comparação com a técnica SIA (sua predecessora temporal directa), há a referir uma potencial diminuição dos tempos de resposta e uma maior frequência de análise.

2.4.4. Referências Bibliográficas

- [1] REIS, B. ; GINÉ, M. ; ZAGATTO, E. ; LIMA, J. ; LAPA, R. - Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling : Concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**. 293 (1994) 129-138.
- [2] Disponível na WWW: <URL:<http://www.nreserch.com> [Consultado 09 Outubro 2009].
- [3] ZAGATTO, E. ; REIS, B. ; OLIVEIRA, C. ; SARTINI, R. ; ARRUDA, M. - Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis. **Analytica Chimica Acta**. 400 (1999) 249-256.
- [4] ROCHA, F. ; REIS, B. ; ZAGATTO, E. ; LIMA, J. ; LAPA, R. ; SANTOS, J. - Multicommutation in flow analysis : concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**. 468 (2002) 119-131.
- [5] ICARDO, M. ; MATEO, J. ; CALATAYUD, J. - Multicommutation as a powerful new analytical tool. **Trends in Analytical Chemistry**. 21 (2002) 366-378.
- [6] CERDÀ, Victor - **Introducción a los métodos de análisis en flujo**. Palma de Maiorca: Ed. Sciware, 2006.
- [7] ALMEIDA, C. ; LAPA, R. ; LIMA, J. ; ZAGATTO, E. ; ARAUJO, M. – An automatic titrator based on a multicommutated unsegmented flow system – Its application to acid-base titrations. **Analytica Chimica Acta**. 407 (2000) 213-223.
- [8] ALMEIDA, C. ; ARAUJO, M. ; LAPA, R. ; LIMA, J. ; REIS, B. ; ZAGATTO, E. – Precipitation titrations using an automatic titrator based on a multicommutated unsegmented flow system. **Analyst**. 125 (2000) 333-340.

- [9] CERDÀ, V ; FORTEZA, R ; ESTELA, J. - Potential of multisyringe flow-based multicommutated systems. **Analytica Chimica Acta**. 600 (2007) 35-45.
- [10] FERES, M. ; FORTES, P. ; ZAGATTO, E. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. - Multi-commutation in flow analysis : Recent developments and applications. **Analytica Chimica Acta**. 618 (2008) 1-17.
- [11] REIS, B. ; MORALES-RUBIO, A. ; GUARDIA, Miguel de la - Environmentally friendly analytical chemistry through automation : comparative study of strategies for carbaryl determination with *p*-aminophenol. **Analytica Chimica Acta**. 392 (1999) 265-272.
- [12] ROCHA, F. ; NÓBREGA, J. ; FILHO, O. – Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. **Green Chemistry**. 3 (2001) 216-220.

2.5. Análise em Fluxo por Multi-Seringa

2.5.1. Conceitos Gerais

A técnica de análise em fluxo por multi-seringa (MSFIA - *Multisyringe Flow Injection Analysis*) apareceu referida pela primeira vez na literatura por Cerdà *et al.* em 1999 [1]. Surgiu como uma alternativa mais robusta relativamente à técnica da multi-comutação, tentando reunir o melhor de FIA e SIA, como sejam a possibilidade de realizar operações multi-canal e a possibilidade de realizar uma selecção de volumes exactos e gestão de fluídos aliado à possibilidade de explorar a noção de amostragem binária [2].

Esta metodologia foi desenvolvida com base na utilização de uma bureta automática que é uma bomba de pistão multicanal com quatro seringas, movidas por um motor e controladas por computador (Figura 2.5.1.1). Na saída de cada seringa existe uma válvula solenóide de duas vias, que permite a ligação a reservatórios com as soluções a usar (estado OFF) ou o seu direccionamento para o sistema de fluxo (estado ON) [2].

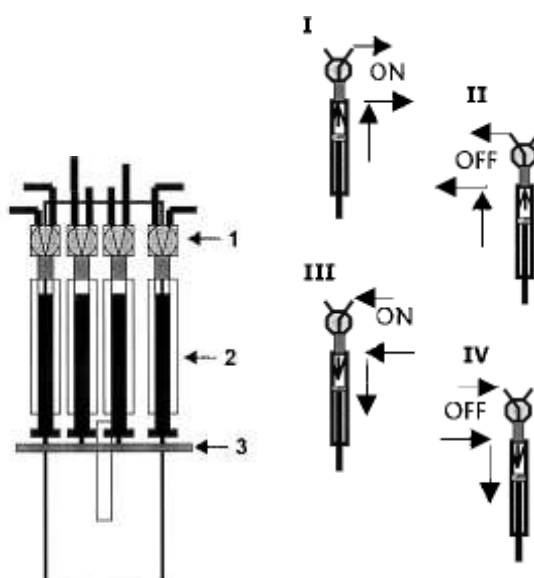


Figura 2.5.1.1. Bureta automática e direcção dos fluídos quando movimentados pela acção do motor. 1: válvulas solenóides de duas vias; 2: seringas; 3: barra do motor. Setas verticais correspondem ao movimento do pistão da bureta; setas horizontais correspondem ao movimento de fluído [3].

2.5.2. Componentes e Modo de Funcionamento

Neste sistema há a considerar a movimentação dos pistões das seringas em simultâneo para dispensa ou carga de soluções assim como a possibilidade de dois estados (ON e OFF) das válvulas solenóides, o que permite conceber a noção de quatro possibilidades de gestão de fluidos (Figura 2.5.2.1). Quando o êmbolo é movimentado para cima, é possível esvaziar o fluído da seringa de volta para os reservatórios das soluções ou para o sistema de fluxo; quando o êmbolo é movimentado para baixo, é possível encher as seringas com as soluções contidas nos reservatórios ou aspirar as soluções do sistema de fluxo [2].

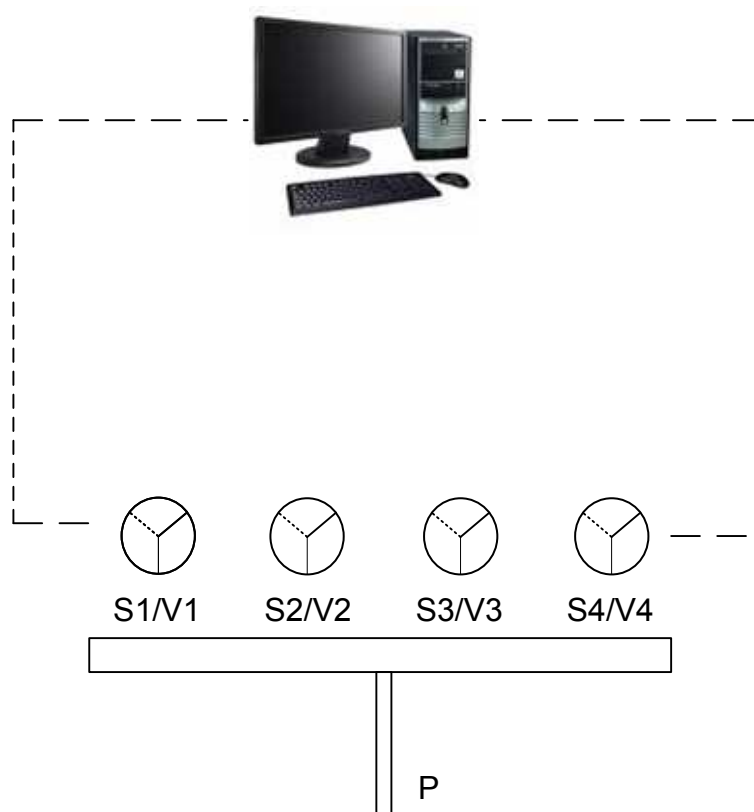


Figura 2.5.2.1. Representação esquemática simplificada de um sistema multi-seringa. S: seringa; V: válvula de comutação; P: pistão.

Podem ser usadas diferentes capacidades de seringas (0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25 mL) o que conjuntamente com as diferentes velocidades do motor permite a obtenção de uma variedade de caudais (desde valores inferiores a $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ até 72 mL min^{-1}) com os quais se pode trabalhar [3].

Há necessidade de acoplar dispositivos às seringas, que permitam o acesso às soluções, nomeadamente válvulas de selecção, de injeção ou de comutação na medida em que a introdução directa de soluções no corpo da seringa não se constitui como uma opção prática, pois implicaria um tempo considerável no ciclo de lavagem para evitar fenómenos de *carryover* assim como contribuiria para um gasto elevadíssimo de amostra e reagentes [2,4].

Nos sistemas automáticos baseados em multi-seringa é possível operar seguindo as duas estratégias sugeridas por Ruzicka e Hansen nos primeiros anos de desenvolvimento da análise em fluxo contínuo, uma baseada num volume dispensado fixo e outra baseada num tempo de dispensa fixo [4,5].

A estratégia baseada em volume fixo consiste no aprisionamento de um determinado volume de amostra numa porção definida de tubagem, podendo ser uma alça de injeção como em FIA. A estratégia baseada em tempo fixo consiste na aspiração ou impulsão de um determinado volume, definido pelo caudal e tempo de actuação do dispositivo escolhido para a propulsão [4,5].

2.5.3. Conclusões

Apesar de o autor Víctor Cerda [1,3], que apresentou pela primeira vez o conceito de multi-seringa, muitas vezes se referir a esta análise como uma modalidade baseada em sistemas de análise multi-comutados e tendo em consideração que ainda há grande debate sobre a questão, um aspecto é no entanto incontornável que é o facto de se terem desenvolvido uma série de novas aplicabilidades analíticas baseadas neste novo método/modalidade e isso está patente no número de aplicações e trabalhos realizados e publicados.

A implementação de estratégias de tratamento das amostras *in line* em multi-seringa como por exemplo, a introdução de esquemas de difusão de gás, de extracção em fase sólida, de extracção líquido-líquido e de digestão por micro-ondas [2], revela um potencial de desenvolvimento de analisadores

inteligentes (sujeitos a retro-alimentação), almejando não só a contemplação do passo da determinação mas também os fastidiosos processamentos de amostra.

Este método/modalidade que é a análise em fluxo por multi-seringa, permitiu a implementação de sistemas multi-canal com robustez.

De acordo com Segundo e Magalhães [2], a maior parte das análises com recurso à multi-seringa empregam amostras ambientais (água, solo, fertilizantes) embora também estejam descritas na literatura aplicações a amostras provenientes da indústria alimentar, da indústria metalúrgica e a amostras biológicas.

2.5.4. Referências Bibliográficas

- [1] CERDÀ, V. ; ESTELA, J. ; FORTEZA, R. ; CLADERA, A. ; BECERRA, E. ; ALTIMIRA, P. ; SITJAR, P. - Flow techniques in water analysis. **Talanta**. 50 (1999) 695-705.
- [2] SEGUNDO, M. ; MAGALHÃES, L. - Multisyringe flow injection analysis : State-of-the-Art and perspectives. **Analytical Sciences**. 22 (2006) 3-8.
- [3] ALBERTÚS, F. ; HORSTKOTTE, B. ; CLADERA, A. ; CERDÀ, V. - A robust multisyringe system for process flow analysis. Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. **Analyst**. 124 (1999) 1373-1381.
- [4] SEGUNDO, M. ; OLIVEIRA, H. ; LIMA, J. ; ALMEIDA, M. ; RANGEL, A. - Sample introduction in multi-syringe flow injection systems : comparison between time-based and volume-based strategies. **Analytica Chimica Acta**. 537 (2005) 207-214.
- [5] RUZICKA, Jaromir ; HANSEN, Elo - **Flow Injection Analysis**. 2^a Ed., 1988.

2.6. Análise em Fluxo em Sistemas de Interface Única

2.6.1. Conceitos Gerais

A técnica de análise em fluxo em sistemas de interface única (SIFA – *Single Interface Flow Analysis*) apareceu referida pela primeira vez na literatura por Ribeiro *et al.* em 2005 [1], baseando-se numa extensa interpenetração de amostra e reagente com formação de uma zona composta, resultando na independência dos volumes introduzidos no sistema.

2.6.2. Componentes e Modo de Funcionamento

Até ao momento foram usados numa montagem analítica de SIFA, buretas automáticas e micro-bombas solenóides como dispositivos de propulsão assim como válvulas solenóides como dispositivos de comutação (Figura 2.6.2.1) [1].

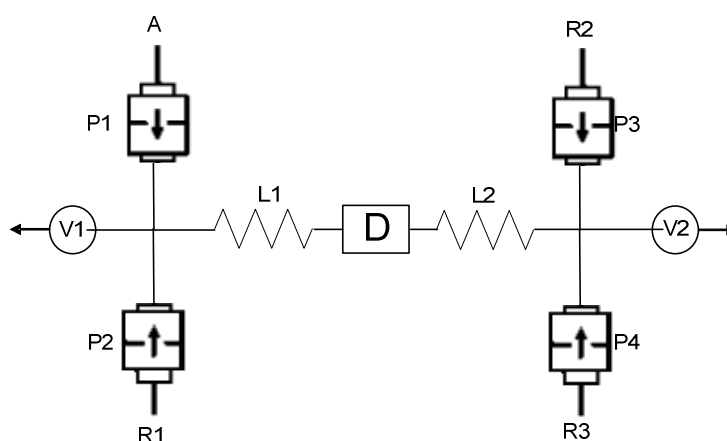


Figura 2.6.2.1. Representação esquemática de sistema de interface única envolvendo a utilização de quatro soluções. P1-P4: bombas solenóides; V1 e V2: válvulas solenóides; L1 e L2: reactores; D: detector; R1-R3: reagentes; A: amostra [1].

A extensão da sobreposição das zonas de amostra e reagente pode ser favorecida pelas inversões múltiplas do fluxo (permitindo efeitos combinados de dispersão axial e radial), mas também pelas características de dinâmica de

fluídos geradas pelas micro-bombas solenóides, no caso de serem usadas e pelo comprimento dos reactores [1].

O detector ocupa de uma maneira geral a posição central na montagem analítica, permitindo (conjuntamente com os dispositivos de inserção/propulsão/comutação e eventualmente dos reactores localizados em cada um dos lados do detector) a realização de inversões múltiplas, o que se constitui como uma possibilidade de variabilidade na manipulação da formação da interface, permitindo inclusivamente a monitorização da reacção ou de uma determinada zona da interface [1].

À medida que se dá a evolução da interface reaccional na tubagem, vai-se formando um gradiente entre amostra e reagente, apresentando características únicas em pontos confinados do sistema, como demonstrado na Figura 2.6.2.2.

Se o tempo de residência for suficiente para se atingir o equilíbrio químico, ter-se-á o valor mais elevado de formação de produto correspondendo a um valor de sinal analítico mais elevado. No entanto, mesmo aumentando o tempo de residência, a altura do sinal analítico é mantida constante, independentemente do uso de reactores longos [1].

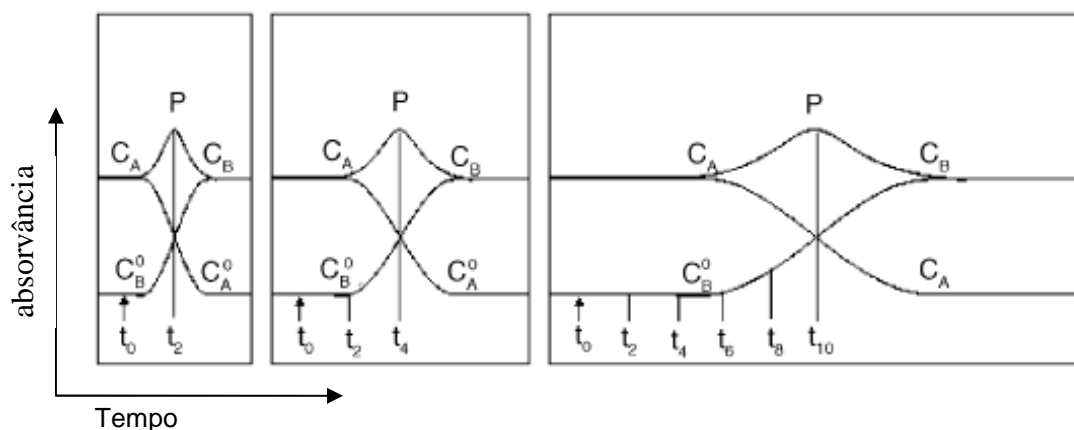


Figura 2.6.2.2. Representação esquemática da evolução do gradiente de concentração no tempo. C_A^0 e C_B^0 : limites de concentração nula para componente A e B; C_A e C_B : concentração de A e B; P: produto reaccional; $t_0 \rightarrow t_{10}$: tempos de residência [Adaptado de 1].

A exploração das vantagens desta metodologia encontra-se bem patente em dois trabalhos recentes de Silvestre *et al.*, que destacam o aproveitamento das características positivas da quimioluminescência (extensão de linearidade; elevada velocidade de resposta e elevada sensibilidade) [2,3] assim como o elevado potencial de robustez de SIFA na formação de complexos de

transferência de carga para determinação espectrofotométrica das hormonas da tiróide T3 e T4 [3].

2.6.3. Conclusões

A metodologia de análise em fluxo em sistemas de interface única, parte das características de mistura “topo a topo” da análise por injeção sequencial alargando esse conceito. Ao não ser necessário a introdução de volumes definidos de amostra e reagente e sendo implementadas inversões de fluxo, o desenvolvimento da zona de reacção está dependente da extensão de sobreposição das zonas adjacentes de amostra e reagente, com formação de gradientes de concentração, o que obvia a necessidade da optimização de volumes à qual se procedia nas técnicas anteriormente referidas.

As reacções lentas são as mais favorecidas com a introdução da análise em fluxo em sistemas de interface única, na medida em que é possível o desenvolvimento da reacção antes da detecção sem ter de recorrer a estratégias de paragem de fluxo e a optimização do comprimento dos reactores, o que implicava sempre um nível de risco no que concerne a um aumento significativo da dispersão [1].

Comparativamente à análise por injeção sequencial, a metodologia SIFA não implica a introdução de volumes definidos e não implica a utilização de reactores de armazenamento.

De uma maneira geral, o SIFA constitui-se como uma técnica simples, rápida, versátil, de pouca manutenção e com uma razão benefício/custo elevado [2,3].

2.6.4. Referências Bibliográficas

[1] RIBEIRO, M. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. ; DIAS, A. ; ZAGATTO, E. – Single reaction interface in flow analysis. **Talanta**. 68 (2005) 351-358.

[2] SILVESTRE, C. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. ; ZAGATTO, E. – Single reaction interface flow system for chemiluminescent monitoring of mannitol based on its hydroxyl radical scavenger activity. **Talanta**. 77 (2008) 518-521.

[3] SILVESTRE, C. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. ; ZAGATTO, E. – Exploiting π -acceptors for the determination of thyroid hormones (T3 and T4) using a single interface flow system. **Talanta**. 79 (2009) 1177-1180.

2.7. Sistemas de Fluxo Multi-Impulsão

Embora a metodologia de fluxo por multi-impulsão tenha surgido anteriormente a SIFA, vai ser somente referida agora e de modo detalhado, devido a ser o processo de gestão de fluidos seleccionado para a implementação do trabalho experimental incluído nesta dissertação.

2.7.1. Antecedentes Históricos

Precedendo o surgimento da metodologia de fluxo por multi-impulsão, há a considerar vários contributos e desenvolvimentos que constituíram as plataformas sobre as quais se veio a desenvolver a multi-impulsão.

Em 1980 Owens *et al.* [1], desenvolveram um sistema analítico designado de “fluxo acelerado por pulsos”, em que através de uma seringa acoplada a um computador, se inseriam volumes reduzidos de solução (pequenos pulsos) a uma velocidade constante. Este sistema permitiu a determinação da cinética de reacções químicas rápidas. A noção de fluxo pulsado associada ao instrumento gerador desses pulsos e seu impacto a nível de mistura de soluções são os principais aspectos a reter deste artigo.

Em 1994 Korenaga *et al.* [2], desenvolveram uma seringa controlada por computador capaz de introduzir volumes reduzidos de solução com possibilidade de mistura completa *in line*. Para analisar o desempenho do dispositivo, procederam a uma avaliação hidrodinâmica da dispersão, recorrendo a uma solução corada e a água, utilizando como detector um microscópio com sistema de registo fotográfico acoplado. As vantagens resultantes deste dispositivo prendem-se com a possibilidade de se ter um sistema controlado por computador construído em materiais resistentes a soluções agressivas e a desgaste mecânico, a possibilidade de dispensa precisa de volumes da ordem de 1 μL , com possibilidade de formação de interfaces parabólicas simétricas (transferência de massa radial reforçada) com mistura rápida e dispersão limitada, utilizável no caso particular de reacções lentas.

Em 1996 Weeks *et al.* [3], validaram o uso de micro-bombas solenóides da companhia Lee Co., através de uma determinação colorimétrica *in situ* (água de mar) de nitrito num sistema de injeção de fluxo. Ao substituírem a bomba peristáltica normalmente usada em FIA por uma micro-bomba solenóide, era seu objectivo incorporar o controlo por computador no sistema, assim como introduzir um dispositivo de reduzidas dimensões, com menores requisitos energéticos e com tempos de manutenção mais elevados.

Em 1997 Carlsson *et al.* [4], desenvolveram um sistema de análise em fluxo que incluía um sistema de propulsão baseado no movimento axial e rotacional de pistão movido por um motor de passo.

Em 1998 Wang *et al.* [5], desenvolveram uma nova abordagem em termos de obtenção de perfis de concentração em análise de fluxo, a designada “química de fluxo pulsado” (PFC – *Pulsed Flow Chemistry*).

Em 1999 van Akker *et al.* [6], estudaram a dispersão de uma amostra injectada num sistema através dos efeitos de fluxo contínuo, pulsado e fluxo com paragem.

Em 2002 Francis *et al.* [7], elaboraram um artigo de revisão sobre o uso de fluxo pulsado na análise em fluxo, referenciando trabalhos que envolveram o uso de micro-bombas para impulsão de soluções em micro-canais gravados em bloco de plástico ou em tubos capilares onde ocorressem processos extractivos assim como o aproveitamento do fluxo pulsado para a detecção quimioluminométrica.

2.7.2. Conceitos Gerais

A técnica de análise em fluxo por multi-impulsão (MPFA – *Multi-pumping Flow Analysis*) apareceu pela primeira vez referida na literatura em 2002 por Lapa *et al.* [8]. Nesta técnica de gestão de fluídos recorre-se a micro-bombas de diafragma operadas por um solenóide interno, sendo elementos com diversas funções (activados individualmente ou de forma combinada) nomeadamente de inserção, propulsão, mistura e comutação das soluções, assegurando um controlo preciso do volume de amostra introduzido no sistema assim como um transporte reproduzível até ao detector (Figura 2.7.2.1) [8-10].

As micro-bombas solenóides usadas nos sistemas baseados no conceito de multi-impulsão constituem-se de uma maneira geral, como os únicos dispositivos activos incluídos no sistema. São responsáveis, através do seu modo de actuação, pela geração de um fluxo pulsado sendo este fluxo pulsado a garantia da formação de um movimento caótico das moléculas de amostra e reagente, com uma rápida e mais eficiente mistura e desenvolvimento da zona de reacção [8].

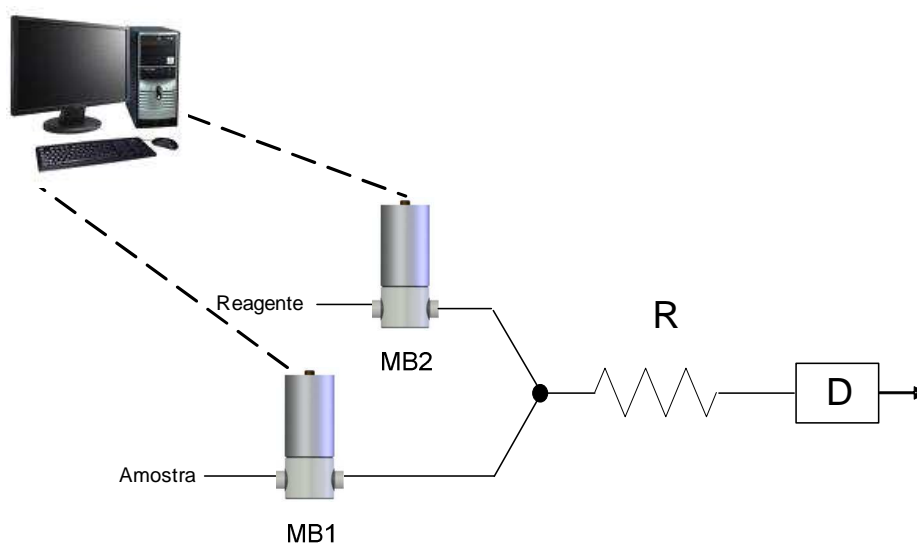


Figura 2.7.2.1. Representação esquemática de uma montagem de fluxo multi-impulsão. R: reactor; D: detector; MB1 e MB2: micro-bombas solenóides.

Considerando a inserção de uma solução de corante e de água como transportador, é possível inferir através da observação do perfil do sinal analítico em escada, a natureza do fluxo pulsado gerado pela actuação das micro-bombas solenóides [8,9]. A visualização deste perfil em escada é possível, limitando a dispersão e realizando um registo do sinal analítico a uma velocidade elevada, nomeadamente recorrendo a uma célula de fluxo com volume interno reduzido.

A amplitude das variações que conferem o perfil em escada, depende do volume de pulso fixo de cada micro-bomba (que é determinado pelas características estruturais de cada bomba solenóide com 8, 20, 25, 50 μL actualmente disponíveis no mercado), da frequência do pulso, da dimensão do

reactor e do volume interno da célula de fluxo (Figura 2.7.2.2) [8,10]. Para volumes de pulso fixo mais baixos (8 μL) verifica-se uma melhor mistura. No que concerne à dimensão do reactor, verifica-se que aumentando a dimensão se melhora potencialmente a dispersão da amostra. Aumentando o diâmetro interno da célula de fluxo, são necessários mais pulsos para permitir a detecção completa da reacção [8].

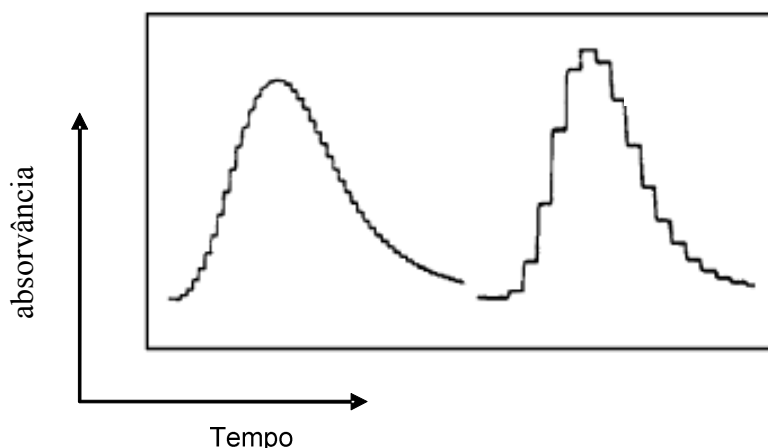


Figura 2.7.2.2. Perfil analítico obtido pela inserção de um corante num sistema analítico multi-impulsão; água como solução transportadora. O primeiro perfil resulta da actuação de uma bomba solenóide de 8 μL e o segundo perfil resulta da actuação de uma bomba solenóide de 25 μL . Adaptado de [9].

Tendo em consideração a existência de diferentes volumes de pulso fixo para as diferentes micro-bombas solenóides disponíveis comercialmente e que a frequência de pulso pode atingir os 250 pulsos por minuto, é possível inferir os caudais máximos obtidos em cada bomba (1,25 / 2,0 / 6,25 e 12,5 mL por minuto) [8].

Sendo o controlo da dispersão, uma das características mais significativas num sistema de fluxo, uma das mais-valias introduzidas pelos sistemas de fluxo multi-impulsão, é precisamente a possibilidade de um controlo da dispersão mais eficaz. Os sistemas multi-impulsão ao permitirem uma mistura mais rápida e eficiente de amostra e reagente assim como a sua manipulação versátil, relativamente ao verificado num sistema de fluxo laminar (existente em todos os sistemas referidos anteriormente), garantem uma dispersão axial mais

reduzida, com a obtenção de sinais analíticos melhorados e com montagens analíticas mais simples [8].

O controlo do fluxo é também melhorado relativamente aos sistemas que operam em fluxo laminar, na medida em que através das medidas baseadas em pulsos é possível obter o conhecimento exacto da posição da amostra no sistema de fluxo, o que facilita por exemplo a adição de reagentes [8].

Depois de terem sido referidas as componentes de propulsão e inserção de soluções pelas micro-bombas solenóides, falta mencionar a componente de comutação que se manifesta na possibilidade de estas serem activadas individualmente ou de forma combinada, com a elaboração de diferentes estratégias de amostragem como sejam a amostragem simples de volume único, a amostragem binária (actuação sequencial das bombas solenóides) e a amostragem por confluência de zonas (actuação simultânea das bombas solenóides) [8,11].

2.7.3. Componentes e Modo de Funcionamento das Micro-Bombas Solenóides

Tal como se referiu anteriormente, o dispositivo mais importante deste sistema é a micro-bomba solenóide, na medida em que se constitui como o único elemento activo do sistema.

A micro-bomba solenóide apresenta um diafragma que é mantido em posição OFF por intermédio de uma mola; essa mola movimenta-se por efeito de um eixo que por sua vez é movimentado por actuação de um solenóide, depois de aplicada uma determinada voltagem (Figura 2.7.3.1). Um volume fixo de fluído entra na câmara interna da bomba e é dispensado quando a voltagem aplicada inicialmente é retirada; a mola força o diafragma novamente para o estado OFF, provocando a impulsão da solução mantida na câmara para o sistema (pulso de volume fixo) [12].

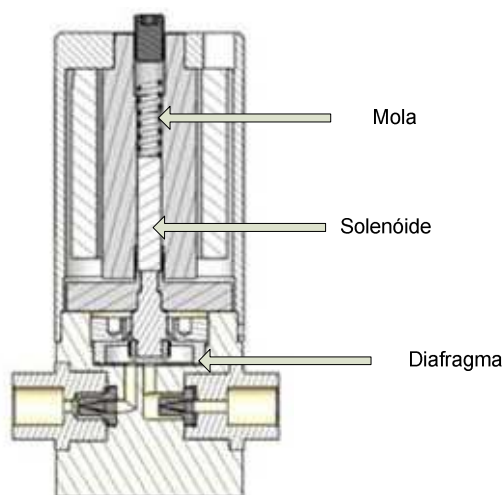


Figura 2.7.3.1. Representação esquemática de uma micro-bomba solenóide da Bio-Chem Valve Inc. [12].

O uso de micro bombas solenóides (Figura 2.7.3.2) garante um percurso não-metálico e inerte para a dispensa de fluídos agressivos, com volumes fixos dispensados com desvios inferiores a 1%. São normalmente estruturas compactas, robustas, precisas, exactas e a sua actuação gera 5 Psi (0.3 bar) de pressão [12]. As 20 milhões de actuações da bomba solenóide permitem um uso contínuo por 3000 horas a 2 HZ [12].



Figura 2.7.3.2. Micro-bomba solenóide Bio-Chem Valve Inc. Boston, USA.

É necessário um transformador para a conversão dos 220 V (a nível de uma tomada) em 12 V para operar as bombas. Através de sinais TTL (*transistor-transistor logic signals*) fornecidos por um cartão de interface controlado por computador, é possível activar o circuito que funciona como *power drive* [8,9]. É ainda necessária a existência de um programa de *software*

para selecção e ajuste de caudais, de volumes de amostra e reagentes, da estratégia de amostragem, do tempo de residência de amostra, *etc.* [8,9].

Como foi referido, em 2002 Lapa *et al.* [8] propuseram uma nova estratégia de gestão de fluídos (Figura 2.7.3.3). O trabalho evidenciou as potencialidades da metodologia proposta recorrendo à determinação espectrofotométrica de Cr (VI) em águas, por reacção com a 1,5-difenilcarbazida e explorando a selecção de diferentes volumes de amostra, de diferentes estratégias de amostragem e de diferentes caudais, visando a optimização da determinação [8].

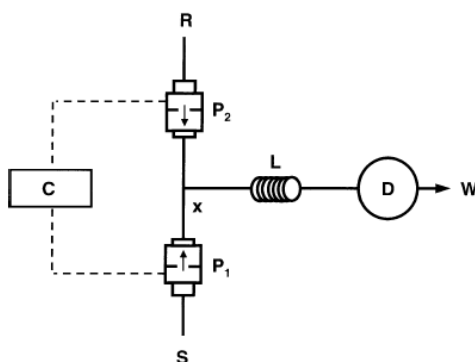


Figura 2.7.3.3. Representação esquemática de uma montagem de fluxo multi-impulsão. P1 e P2: micro-bombas solenóides; S: amostra; R: reagente; L: reactor; D: detector; W: esgoto; C: interface de controlo; X: confluência [8].

Posteriormente, novos trabalhos com a utilização da multi-impulsão foram surgindo na literatura, apresentando uma tendência para a crescente complexidade da montagem, com intuito último de dar resposta a um conjunto de situações analíticas cada vez mais exigente. O trabalho desenvolvido por Carneiro *et al.* em 2005 [13], visa ultrapassar as dificuldades de manuseamento de amostras viscosas e em que se procede à determinação espectrofotométrica de glucose e frutose em xaropes, com recurso a uma montagem analítica com 9 micro-bombas solenóides (Figura 2.7.3.4). O xarope foi inserido em cápsulas de gelatina e transportado para o laboratório com inserção directa numa câmara de dissolução, com posterior determinação dos açúcares redutores (glucose e frutose discriminadas pelas diferentes cinéticas de oxidação observadas) [13].

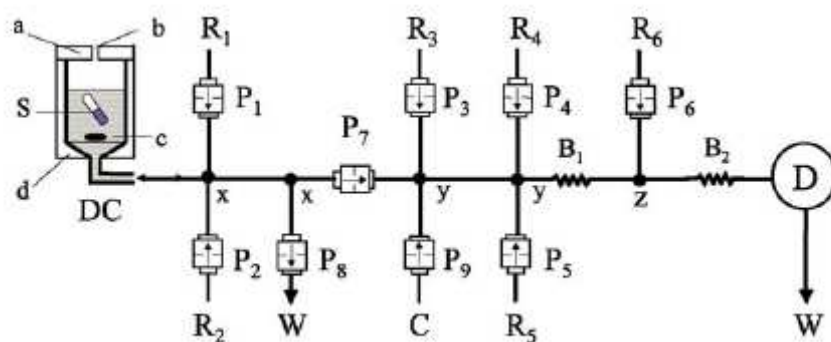


Figura 2.7.3.4. Representação esquemática de uma montagem de fluxo multi-impulsão para determinação de glicose e frutose em xaropes. P₁ a P₈: micro bombas solenóides; B₁ e B₂: reatores; x, y, z: confluências; C: fluido transportador; R₁ a R₆: reagentes; S: amostra; DC: câmara de dissolução; D: detector; w: esgoto [13].

No entanto, um compromisso entre o alargamento de possibilidades de resposta analítica e uma não exagerada complexidade dos sistemas tem de ser feito a todo o momento. Nesse sentido e dando resposta a uma situação analítica complexa de uma forma o mais simples possível, Alves *et al.* [14], publicaram em 2009 um trabalho de determinação espectrofotométrica de açúcares totais redutores em sumos de cana de açúcar e xaropes, envolvendo uma hidrólise *in line* da sacarose e redução alcalina dos agentes redutores a 98°C (Figura 2.7.3.5). A exploração de fluxos pulsados com a inerente eficiência de transporte de massa radial, permitiu um melhor transporte de calor no interior da amostra. Este trabalho pode ser visto como um passo importante para o controlo de qualidade na indústria de produção de açúcar, na medida em que permite a obtenção de informação sobre a qualidade da matéria-prima usada de modo simples, fácil e eficiente.

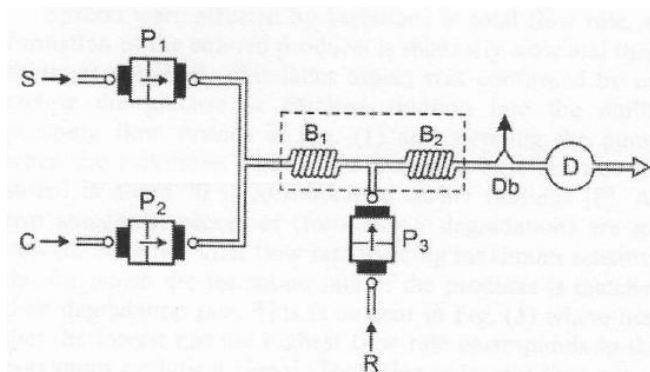


Figura 2.7.3.5. Representação esquemática de uma montagem de fluxo multi-impulsão para determinação dos açúcares redutores totais. P₁ a P₃: micro bombas solenóides; B₁ e B₂: reactores; C: fluido transportador; R: reagente; S: amostra; Db: unidade de remoção de bolhas; D: detector [14].

2.7.4. Dinâmica de Fluidos no Contexto da Multi-Impulsão

Posteriormente à validação da actuação das micro-bombas solenóides, novos dispositivos geradores de pulsos foram desenvolvidos.

Weeks e Johnson [3] mencionaram o uso de micro-bombas solenóides como uma alternativa à bomba peristáltica; procederam a uma determinação por injeção de fluxo *in situ*, de nitrito em água do mar, defendendo a substituição da bomba peristáltica por micro-bombas solenóides, pelo sentido de redução do tamanho de bomba usado, por menores requisitos de consumo energético, por maiores períodos de manutenção e pela possibilidade de incorporar controlo por intermédio de um microprocessador. Consideraram no entanto, a natureza pulsada das micro-bombas solenóides como um inconveniente em detrimento do fornecimento de um fluxo contínuo e suave por parte das bombas peristálticas.

Francis *et al.* [7] com o seu trabalho publicado em 2002 fazem uma resenha dos dispositivos desenvolvidos pelo seu grupo de trabalho, que exploram as características de fluxo pulsado, comparando com outros sistemas de fluxo programados. Se por um lado havia a ideia de inconveniente funcional no que diz respeito à natureza pulsada da actuação das micro-bombas solenóides (a percepção da altura era que a natureza laminar do transporte de fluidos não deveria ser perturbada), por outro lado e embora admitindo que a

actuação mecânica das bombas peristálticas gerava uma oscilação no fluxo, este não era reproduzível.

A ocorrência de pulsos num sistema de fluxo sempre foi encarada de forma problemática na implementação de métodos automáticos com funcionamento baseado em fluxo laminar. Com o advento da multi-impulsão, os pulsos gerados começaram a prefigurar-se como uma vantagem, como sugerido por vários autores mencionados em seguida.

Dias *et al.* [15] publicam em 2007 uma comparação crítica de sistemas analíticos que exploram fluxos pulsados e fluxos laminares. Segundo os autores, a turbulência é atingida nos sistemas multi-impulsão no momento da inserção das soluções (período GO), evitando referir-se à instalação de um fluxo turbulento e preferindo a designação de fluxo pulsado, na medida em que há a considerar os períodos STOP de funcionamento das bombas solenóides, não havendo tempo para se instalar completamente um regime turbulento. Este trabalho foi importante para perceber a diferença entre fluxo pulsado (que verdadeiramente caracteriza a multi-impulsão) e fluxo turbulento.

Muito recentemente, Fortes *et al.* [16] publicam um artigo que inequivocamente confirma a mistura turbulenta inerente aos sistemas multi-impulsão pela forma dos picos analíticos obtidos, pelos resultados obtidos para reacções químicas lentas, pelo estudo da eficiência de transferência de calor, pelo estudo da influência da reversão do fluxo, pela criação de leitos fluidizados e pelo cálculo do número de Reynolds assim como por imagens do que acontece em termos de dinâmica de fluídos no interior de um sistema multi-comutado comparado com um sistema multi-impulsão.

A característica fundamental dos sistemas de fluxo multi-impulsão é a geração de um fluxo pulsado, o que implica o conhecimento da hidrodinâmica, que representa um estudo macroscópico do movimento e interações das moléculas de fluído [17].

Um escoamento em regime laminar implica que camadas de fluído adjacentes se desloquem segundo trajectórias paralelas e não-entrecruzáveis (com a mesma velocidade ou com velocidade ligeiramente diferente) [17]. Um escoamento em regime turbulento implica que camadas de fluído adjacentes se desloquem em trajectórias cruzadas e aleatórias e com velocidades distintas. Convém no entanto referir que o comportamento de um fluído turbulento não é

exclusivamente aleatório, na medida em que há a ocorrência de estruturas organizadas, designadas por vórtices ou turbilhões, responsáveis pela componente mais importante em termos de transporte de massa, de quantidade de movimento ou de calor [17].

Para avaliar as diferenças entre os regimes de escoamento de fluídos, recorre-se a várias equações que relacionam as diferentes forças, nomeadamente forças de inércia, forças gravíticas, viscosidade, tensão superficial. Existe em particular um parâmetro adimensional, que relaciona os efeitos convectivos com os efeitos difusivos, isto é, relaciona as componentes não lineares da inércia com a dissipação viscosa, que é o número adimensional de Reynolds (que é traduzido pela equação $Re = \rho v D / \mu$ em que ρ – densidade; v – velocidade de referência; D – dimensão de referência; μ – viscosidade) [17,18]. O regime laminar corresponde a valores baixos do número de Reynolds, sendo que qualquer perturbação que ocorra é atenuada pela acção da componente viscosa que não sendo evitada, traduzir-se-á numa perturbação instalada e estar-se-á nessa situação perante um regime turbulento (numa primeira fase uma turbulência intermitente e posteriormente uma turbulência desenvolvida como pode ser verificado na Figura 2.7.4.1) [17].

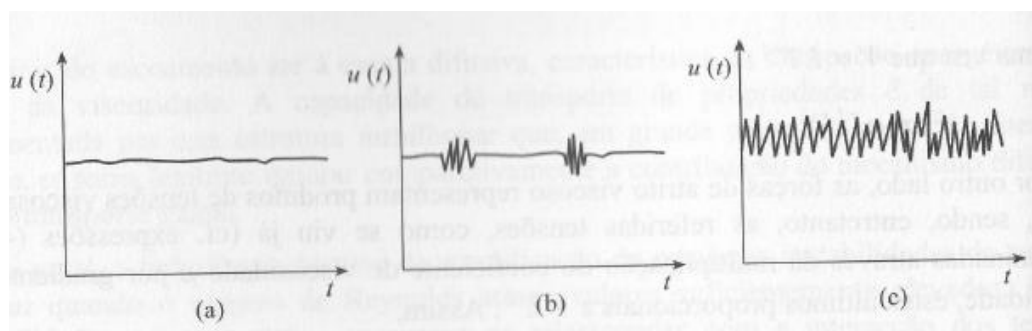


Figura 2.7.4.1. Representação esquemática de regimes de escoamento. (a): Regime laminar; (b): Regime de transição; (c): Regime turbulento [17].

O escoamento turbulento apresenta elementos tridimensionais e rotacionais (vórtices) que promovem a deformação do fluído com aumento da sua energia de inércia e cinética. Em consequência, formam-se gradientes locais, permitindo uma alta difusibilidade e assim, uma eficiente mistura [17].

Bradshaw apresentou em 1971 uma definição de turbulência, que tenta tornar um fenómeno complexo em algo mais inteligível: “turbulência é um movimento de tipo tridimensional e dependente do tempo, em que, pelo mecanismo do estiramento de vórtices, as flutuações de velocidade são levadas a estender-se por toda uma gama de comprimentos, desde um mínimo determinado pelas forças viscosas até um máximo definido pelas condições limítrofes do escoamento” [17].

A transição de regime de escoamento, corresponde a um valor de Reynolds crítico, acima ou abaixo do qual, se instalará uma turbulência ou se manterá um regime laminar respectivamente [17]. Neste sentido e de uma maneira geral pode-se considerar as seguintes ordens de grandeza:

$0 < Re < 10^3$ – Escoamento Laminar

$10^3 < Re < 10^4$ – Transição de regime laminar e turbulento

$10^4 < Re < 10^6$ – Escoamento Turbulento

Voltando ao artigo de Fortes *et al.* [16], os autores procederam ao cálculo do número de Reynolds, considerando $Re = 2\rho Q / \pi r \mu$ (em que ρ – densidade; Q – caudal; r – raio; μ – viscosidade). Obtêm um valor de $Re = 911 \pm 115$, advogando no entanto a possibilidade de na realidade se obter um valor mais elevado, na medida em que nos cálculos não foram tidos em consideração aspectos como o volume interno da célula de fluxo, o tempo de resposta do detector, o alargamento do pico analítico da amostra assim como eventuais modificações da geometria das tubagens, concluindo que não há condições para se instalar um regime de escoamento turbulento mas sim um sistema de escoamento de transição entre o regime laminar e turbulento.

2.7.5. Aplicações e Implementação

O sistema de fluxo por multi-impulsão conta já com oito anos de trabalhos publicados, com diversas propostas de aplicação a diferentes tipos de amostras e com utilização de diferentes sistemas de detecção.

Com base nas características e potencialidades referidas anteriormente, é possível inferir da grande atracção que esta metodologia exerce quando se pensa na implementação de procedimentos analíticos automatizados,

compactos, de custo reduzido, com baixo consumo de reagentes e amostra e baixa geração de resíduos.

Na Tabela 2.7.5 são referidos resumidamente trabalhos publicados, baseados na metodologia de fluxo por multi-impulsão, referindo-se as diferentes espécies determinadas nas diferentes amostras, o método de detecção utilizado, o limite de detecção e o ritmo de amostragem obtidos.

Tabela 2.7.5 - Aplicações de sistemas multi-impulsão e características analíticas.

Determinação	Método de detecção	LD	Amostra	Ritmo amostragem (h ⁻¹)	Observações	Ref.
Cr (VI)	UV-vis	-	Água Natural	80	-	8
Ácido fítico	UV-vis	1,0 mg L ⁻¹	Extracto de plantas	150	-	11
Dipirona	UV-vis	1,0 mg L ⁻¹	Preparações farmacêuticas	50	-	26
Isoniazida	UV-vis	-	Preparações farmacêuticas	20	Buretas automáticas	27
Bromexina	UV-vis	2,0 mg L ⁻¹	Preparações Farmacêuticas	45	-	28
Glucose e frutose	UV-vis	-	Xarope	50	<i>Flow-Batch System</i>	13
Metformina	QL	0,94 mg L ⁻¹	Preparações Farmaceuticas	95	-	29
Fe(III)/Ferro total	UV-vis	10 ng L ⁻¹ ; 0,05 mg L ⁻¹ ; 0,2 mg L ⁻¹	Água do mar	9,120;120	Fe(III) com SPE; Fe (III) sem SPE; Fe total sem SPE	30
Carvedilol	QL	8,7x10 ⁻⁹ mol L ⁻¹	Preparações farmacêuticas	65	-	31
Ambroxol	UV-vis	-	Preparações Farmacêuticas	60	-	32
Indometacina	Fluorimetria	1,6x10 ⁻⁹ mol L ⁻¹	Preparações farmacêuticas	30	SIA	33
H ₂ O ₂	QL	4x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	-	120	-	34
Amónio	QL	6x10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	-	120	-	34
Ácido Ascórbico, resveratrol, trolox	QL	-	Preparações Farmacêuticas e extractos de chá	160;70	-	35
Ácido Ascórbico	QL	0,17 mmol L ⁻¹	Sumos de fruta (forma pó)	100	Controlo de Qualidade	36
Surfactantes aniónicos	UV-vis	0,034 mg L ⁻¹	Água de lavagem	60	-	37
Cu(II)	EAAAC	0,035 mg L ⁻¹	Soro	360	-	20

Determinação	Método de detecção	LD	Amostra	Ritmo amostragem (h ⁻¹)	Observações	Ref.
Fósforo dissolvido reactivo	UV-vis	0,08 mg L ⁻¹	Águas residuais	75	-	38
Fósforo orgânico dissolvido	UV-vis	0,5 mg L ⁻¹	Águas residuais	11	-	38
Buspirona	UV-vis	2,8 mg L ⁻¹	Preparações Farmacêuticas	55	-	39
Ferro, Vanádio	UV-vis	-	Ligas Fe-V	50	-	40
Zinco	UV-vis	0,1 mg L ⁻¹	Digestos de plantas	30	Reagentes sólidos; leito fluidizado	41
Surfactantes Catiónicos	UV-vis	0,035 mg L ⁻¹	Águas de Superfície	72	-	42
Captopril	UV-vis	-	Preparações Farmacêuticas	100	-	43
Fosfato	LIF	-	Solo	-	-	15
Fluoxetina	QL	0,31 mg L ⁻¹	Preparações farmacêuticas	136	Fármacos Falsificados	44
Gabapentina	UV-vis	-	Preparações Farmacêuticas	28	Piezoeléctricas	45
Amónia	QL	0,02 mg L ⁻¹	Águas naturais	50	Unidade de difusão de gás	46
Rádio	Pp/Actividade alfa	-	Águas naturais	-	Multi-seringa	24
Trimipramina	UV-vis	1,15 mg L ⁻¹	Preparações Farmacêuticas	50	-	47
Nitrito/Nitrato	UV-vis	0,013; 0,039 mg L ⁻¹	Águas Naturais	55 / 27	-	48
Levodopa/Benserazida	QL	-	Preparações Farmacêuticas	-	Determinação Simultânea; Calibração Multivariada	49
Gabapentina	QL	40 µmol L ⁻¹	Preparações farmacêuticas	41	-	50
Cloreto/sulfato	Turbidimetria	-	Águas naturais	60	Ensaio Prévio <i>in line</i>	51
Taninos Totais	UV-vis	0,3 mg L ⁻¹	Bebidas	75	-	52
TRS	UV-vis	-	Sumos de cana de açúcar e xaropes	65	Controlo de Qualidade; hidrólise <i>in line</i> e degradação alcalina dos açúcares a 98°C	14
Indapamida	UV-vis	-	Preparações farmacêuticas	25	-	53

UV-vis: Espectroscopia de UV-visível; QL: Quimioluminescência; SPE: Extração em fase sólida; TRS: açúcares redutores totais; LIF: Fluorescência induzida por laser; Pp: Precipitação; EAAAC: Espectrofotometria por absorção atómica por atomização em chama.

2.7.6. Hifenização de Técnicas

O recurso a técnicas combinadas (técnicas hifenizadas) surge como uma alternativa a considerar, com o objectivo de tirar o máximo partido de cada uma das metodologias empregues em determinações de fluxo, de modo a servir o objectivo último traçado para uma determinada situação analítica em particular [19]. A título de exemplo de técnicas hifenizadas, pode-se referir os trabalhos recentemente realizados com multi-comutação e multi-impulsão por Lopes *et al.* [20], por Rodrigues *et al.* [21], por Pires *et al.* [22] e por Infante *et al.* [23].

Fajardo *et al.* [24] desenvolveram em 2007 um método de pré-tratamento e concentração de rádio em águas com recurso à técnica da multi-seringa e à técnica da multi-impulsão. Obtiveram limites de detecção mais baixos que os anteriormente alcançados por outras técnicas de fluxo assim como foi possível analisar amostras de volume mais elevado, aumentando também o ritmo de análise.

No seguimento desta noção de hifenização, ressalte-se ainda a possibilidade de implementação de diferentes procedimentos de processamento de amostras sem modificações da montagem analítica, indo ao encontro de uma das principais características dos sistemas multi-impulsão, que é a versatilidade dos mesmos. Rocha *et al.* [25] publicaram em 2006 um artigo mencionando a noção de *multi-purpose system* e apresentando diferentes procedimentos (diluições, calibrações com uma solução, método da adição de padrão, titulações, estratégias de aumento de tempo de residência) sem alterar a estrutura física do sistema, recorrendo a uma estratégia de amostragem binária, obtida pelo uso de micro-bombas solenóides.

2.7.7. Conclusões

Os sistemas multi-impulsão ao se basearem na presença de apenas um dispositivo activo multi-função permitiram o advento de uma simplicidade e versatilidade sem precedentes.

A simplicidade de configuração (operacional, de controlo e de manutenção), a rapidez das determinações, a precisão e exactidão obtidos, a

melhoria das condições de mistura, o elevado potencial de automatização e de miniaturização, constituem-se como as características essenciais para reconhecer nesta metodologia um elevado potencial de aplicabilidade [9].

A definição de volumes e o modo de inserção da amostra no sistema de fluxo são operações que diferem marcadamente entre metodologias: na análise por injeção de fluxo, o volume de amostra inserido é definido pelo volume interno da alça acoplada à válvula de injeção; na análise por injeção sequencial e na análise em fluxo por multi-comutação, o volume de amostra é definido pelo tempo de amostragem (a uma taxa de fluxo definido); na análise por fluxo multi-impulsão, o volume de amostra é definido pelo volume de pulso fixo das bombas e pelo número desses pulsos [26].

A simplicidade das montagens analíticas, o controlo do fluxo pulsado originado pelas micro-bombas através de uma forma automatizada e individual, permite reconhecer os meios para se desenvolver um sistema de fluxo caracterizado por um baixo consumo de amostra e reagentes, por um desenvolvimento rápido da reacção e por uma possibilidade acrescida de intervenção na zona de reacção sem reconfigurações físicas do sistema [8,9].

Estas características tornam-se vantajosas, quando são rentabilizadas no desenvolvimento de sistemas de análise em fluxo por multi-impulsão com detecção por quimioluminescência, pseudo-titulações e titulações, estratégias de paragem de fluxo e determinações cinéticas, utilização de membranas de diálise/unidades de difusão gasosa, processos de extracção, uso de resinas de permuta iónica e de enzimas imobilizadas, melhoria da transferência de calor no aquecimento dos fluídos e em trabalhos de campo [9].

Há também a considerar a diminuição do fenómeno de *carryover* e uma diminuição da variação dos índices de refacção (obviando o efeito Schlieren) como características favoráveis [8,9].

2.7.8. Referências Bibliográficas

[1] OWENS, G. ; TAYLOR, R. ; RIDLEY, T. ; MARGERUM, D. – Pulsed-flow instrument for measurement of fast reactions in solution. **Analytical Chemistry**. 52 (1980) 130-138.

- [2] KORENAGA, T. ; ZHOU, X. ; MORIWAKE, T. ; MURAKI, H. ; NAITO, T. ; SANUKI, S. – Computer-controlled micropump suitable for precise microliter delivery and complete in-line mixing. **Analytical Chemistry**. 66 (1994) 73-78.
- [3] WEEKS, D. ; JOHNSON, K. – Solenoid pumps for flow injection analysis. **Analytical Chemistry**. 68 (1996) 2717-2719.
- [4] CARLSSON, K. ; JACOBSEN, H. ; JENSEN, A. ; STENSTROM, T. ; KARLBERG, B. – Micro-continuous flow system for wet chemical analysis. **Analytica Chimica Acta**. 354 (1997) 35-42.
- [5] WANG, X. ; CARDWELL, T. ; CATRALL, R. ; JENKINS, G. – Pulsed flow chemistry : a new approach to the generation of concentration profiles in flow analysis. **Analytical Communications**. 35 (1998) 97-101.
- [6] VAN AKKER, E. ; BOS, M. ; VAN DER LINDEN, W. – Continuous, pulsed and stopped flow in a μ -flow injection system (numerical vs experimental). **Analytica Chimica Acta**. 378 (1999) 111-117.
- [7] FRANCIS, P. ; LEWIS, S. ; LIM, K. ; CARLSSON, K. ; KARLBERG, B. – Flow analysis based on a pulsed flow of solution : theory, instrumentation and applications. **Talanta**. 58 (2002) 1029-1042.
- [8] LAPA, R. ; LIMA, J. ; REIS, B. ; SANTOS, J. ; ZAGATTO, E. – Multi-pumping in flow analysis : concepts, instrumentation, potentialities. **Analytica Chimica Acta**. 466 (2002) 125-132.
- [9] LIMA, J. ; SANTOS, J. ; DIAS, A. ; RIBEIRO, M. ; ZAGATTO, E. – Multi-pumping flow systems: an automation tool. **Talanta**. 64 (2004) 1091-1098.
- [10] CERDÀ, Victor - **Introducción a los métodos de análisis en flujo**. Palma de Maiorca: Ed. Sciware, 2006.

- [11] CARNEIRO, J. ; ZAGATTO, E. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow system. **Analytica Chimica Acta**. 474 (2002) 161-166.
- [12] Disponível na WWW: <URL:<http://www.biochem.com> [Consultado 13 Novembro 2009].
- [13] CARNEIRO, J. ; DIAS, A. ; ZAGATTO, E. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – An improved sampling approach in multi-pumping flow systems applied to the spectrophotometric determination of glucose and fructose in syrups. **Analytica Chimica Acta**. 531 (2005) 279-284.
- [14] ALVES, E. ; FERES, M. ; ZAGATTO, E. ; LIMA, J. – Exploiting pulsed flows for heating improvement : Application to determination of total reducing sugars in molasses and sugar-cane juices . **Current Analytical Chemistry**. 5 (2009) 65-69.
- [15] DIAS, A. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. ; QUINTELLA, C. ; LIMA, A. ; ZAGATTO, Elias – A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**. 388 (2007) 1303-1310.
- [16] FORTES, P. ; FERES, M. ; SASAKI, M. ; ALVES, E. ; ZAGATTO, E. ; PRIOR, J. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – Evidences of turbulent mixing in multi-pumping flow systems. **Talanta**. 79 (2009) 978-983.
- [17] OLIVEIRA, Luís ; LOPES, António – **Mecânica dos fluidos**. Edições Técnicas e Profissionais, 2ª Ed. 2007.
- [18] PINHO, Maria ; PRAZERES, Duarte - **Fundamentos de transferência de massa**. Lisboa: IST Press, 2008.
- [19] Disponível na www:<url:<http://www.uib.es/depart/dqu/dquiweb/lectures.pdf> [Consultado 15 Outubro 2009].

- [20] LOPES, C. ; ALMEIDA, A. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – Automatic flow system for the sequential determination of copper in serum and urine by flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. 555 (2006) 370-376.
- [21] RODRIGUES, E. ; LAPA, R. ; LIMA, J. – A multicommutated flow system based on an opened-loop with micropump propulsion. **Analytical Letters**. 40 (2007) 1632-1645.
- [22] PIRES, C. ; REIS, B. ; MORALES-RUBIO, Á. ; GUARDIA, Miguel de la – Speciation of chromium in natural waters by micropumping multicommutated light emitting diode photometry. **Talanta**. 72 (2007) 1370-1377.
- [23] INFANTE, C. ; MORALES-RUBIO, A. ; GUARDIA, Miguel de la ; ROCHA, F. – A multicommutated flow system with solenoid micro-pumps for paraquat determination in natural waters. **Talanta**. 75 (2008) 1376-1381.
- [24] FAJARDO, Y. ; Gómez, E. ; GARCÍAS, F. ; CERDÀ, V. ; CASAS, M. – Development of an MSFIA-MPFS pre-treatment method for radium determination in water samples. **Talanta**. 71 (2007) 1172-1179.
- [25] ROCHA, F. ; INFANTE, C. ; MELCHERT, W. – A Multi-purpose flow system based on multi-commutation. **Spectroscopy Letters**. 39 (2006) 651-668.
- [26] LIMA, J. ; SÁ, S. ; SANTOS, J. ; ZAGATTO, E. – Multi-pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 32 (2003) 1011-1017.
- [27] PRIOR, J. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – Sampling strategies exploiting multi-pumping flow systems. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**. 375 (2003) 1234-1239.

- [28] DIAS, A. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. ; ZAGATTO, E. – Multi-pumping flow systems for spectrophotometric determination of bromhexine. **Analytica Chimica Acta**. 499 (2003) 107-113.
- [29] MARQUES, K. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – A catalytic multi-pumping flow system for the determination of chemiluminometric determination of metformin. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**. 382 (2005) 452-457.
- [30] PONS, C. ; FORTEZA, R. ; CERDÀ, V. – Multi-pumping flow system for the determination, solid-phase extraction and speciation analysis of iron. **Analytica Chimica Acta**. 550 (2005) 33-39.
- [31] PIRES, C. ; MARQUES, K. ; SANTOS, J. ; LAPA, R. ; LIMA, J. ; ZAGATTO, E. – Chemiluminometric determination of carvedilol in a multi-pumping flow system. **Talanta**. 68 (2005) 239-244.
- [32] SANTOS, J. ; CLAUSSE, A. ; LIMA, J. ; SARAIVA, M. ; RANGEL, A. – Determination of ambroxol in an automated multi-pumping pulsed flow system. **Analytical Sciences**. 21 (2005) 461-464.
- [33] PINTO, P. ; SARAIVA, M. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – A pulsed sequential injection analysis flow system for the fluorimetric determination of indomethacin in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**. 539 (2005) 173-179.
- [34] ROCHA, F. ; RÓDENAS-TORRALBA, E. ; REIS, B. ; MORALES-RÚBIO, A. ; GUARDIA, Miguel de la – A portable and low cost equipment for flow injection chemiluminescence measurements. **Talanta**. 67 (2005) 673-677.
- [35] MENESES, S. ; MARQUES, K. ; PIRES, C. ; SANTOS, J. ; FERNANDES, E. ; LIMA, J. ; ZAGATTO, E. – Evaluation of the total antioxidant capacity by using a multipumping flow system with chemiluminescent detection. **Analytical Biochemistry**. 345 (2005) 90-95.

- [36] PIRES, C. ; LAVORANTE, A. ; MARCONI, L. ; MENESES, S. ; ZAGATTO, E. – A multi-pumping flow system for chemiluminometric determination of ascorbic acid in powdered materials for preparation of fruit juices. **Microchemical Journal**. 83 (2006) 70-74.
- [37] LAVORANTE, A. ; MORALES-RUBIO, Á. ; GUARDIA, Miguel de la ; REIS, B. – Micro-pumping flow system for spectrophotometric determination of anionic surfactants in water. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**. 381 (2005) 1305-1309.
- [38] PONS, C. ; TÓTH, I. ; RANGEL, A. ; FORTEZA, R. ; CERDÀ, V. – Multi-pumping flow system for the determination of dissolved orthophosphate and dissolved organic phosphorus in wastewater samples. **Analytica Chimica Acta**. 572 (2006) 148-154.
- [39] RIBEIRO, M. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. ; DIAS, A. ; ZAGATTO, E. – Fully automated spectrophotometric method for the determination of buspirone in pharmaceutical preparations. **Analytical Letters**. 39 (2006) 2243-2253.
- [40] FORTES, P. ; MENESES, S. ; ZAGATTO, E. – A novel flow-based strategy for implementing differential kinetic analysis. **Analytica Chimica Acta**. 572 (2006) 316-320.
- [41] RIBEIRO, M. ; DIAS, A. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. ; ZAGATTO, E. – Fluidized beds in flow analysis: use of ion-exchange separation for spectrophotometric determination of zinc in plant digests. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**. 384 (2006) 1019-1024.
- [42] LAVORANTE, A. ; PIRES, C. ; MORALES-RUBIO, Á. ; GUARDIA, Miguel de la ; REIS, B. – A spectrophotometric flow procedure for the determination of cationic surfactants in natural waters using a solenoid micro-pump for fluid propulsion. **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**. 86 (2006) 723-732.

- [43] PRIOR, J. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – Exploiting kinetic spectrophotometric determination of captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor in a multi-pumping flow system. **Analytica Chimica Acta**. 600 (2007) 183-187.
- [44] MARQUES, K. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – Application of a pulsed flow analysis for chemiluminescent screening of fluoxetine counterfeit pharmaceuticals. **Analytical Letters**. 40 (2007) 2241-2251.
- [45] RIBEIRO, M. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – Piezoelectric pumping in flow analysis : Application to the spectrophotometric determination of gabapentin. **Analytica Chimica Acta**. 600 (2007) 14-20.
- [46] MARQUES, K. ; PIRES, C. ; SANTOS, J. ; ZAGATTO, E. ; LIMA, J. – A multi-pumping flow system for the chemiluminescent determination of ammonium in natural waters. **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**. 87 (2007) 77-85.
- [47] RIBEIRO, D. ; PRIOR, J. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – Automatic multipumping flow system for handling viscous solutions : Application to the spectrophotometric determination of trimipramine. **Analytical Letters**. 41 (2008) 2684-2696.
- [48] PONS, C. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. ; FORTEZA, R. ; CERDÀ, V. – Multi-pumping flow system for the determination of nitrite and nitrate in water samples. **Microchimica Acta**. 161 (2008) 73-79.
- [49] MARQUES, K. ; SANTOS, J. ; LOPES, J. ; LIMA, J. – Simultaneous chemiluminometric determination of levodopa and benserazide in a multi-pumping flow system with multivariate calibration. **Analytical Sciences**. 24 (2008) 985-991.

- [50] MANERA, M. ; MIRÓ, M. ; RIBEIRO, M. ; ESTELA, J. ; CERDÀ, V. ; SANTOS, J. ; LIMA, J. – Rapid chemiluminometric determination of gabapentin in pharmaceutical formulations exploiting pulsed-flow analysis. **The Journal of biological and Chemical Luminescence**. 24 (2008) 10-14.
- [51] FORTES, P. ; FERES, M. ; ZAGATTO, JE. – An expert flow system involving in-line prior assay for turbidimetric determination of chloride and sulphate in natural waters. **Talanta**. 77 (2008) 571-575.
- [52] INFANTE, C. ; SOARES, V. ; KORN, M. ; ROCHA, F. – An improved flow-based procedure for microdetermination of total tannins in beverages with minimized reagent consumption. **Microchimica Acta**. 161 (2008) 279-283.
- [53] RIBEIRO, D. ; PRIOR, J. ; SANTOS, J. ; LOPES, J. ; LIMA, J. – Exploiting the oxidative coupling reaction of MBTH for indapamide determination. **Talanta**. 79 (2009) 1161-1168.

CAPÍTULO 3 : FLUORQUINOLONAS

3. Fluorquinolonas

3.1. Indicações Terapêuticas e Mecanismo de Acção

As quinolonas são antibióticos sintéticos de largo espectro, derivados do ácido nalidíxico, sendo os mais comumente usados os derivados fluorados, uma vez que são mais activos e apresentam um maior espectro de acção, designando-se genericamente por fluorquinolonas ou 4-quinolonas (Figura 3.1.1) [1,2].

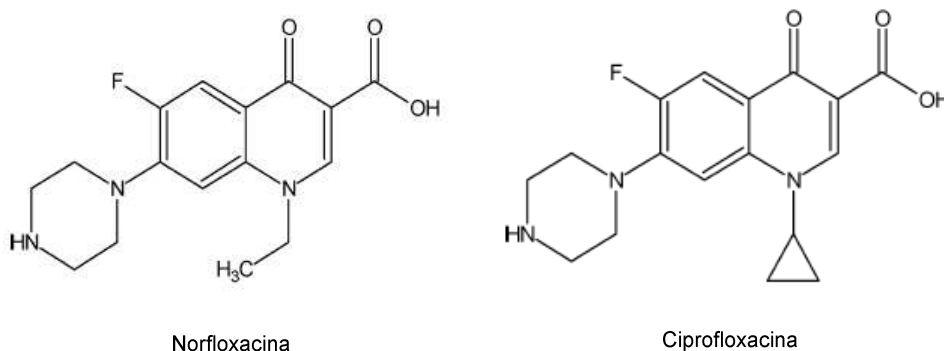


Figura 3.1.1. Representação esquemática da estrutura da norfloxacin e ciprofloxacin.

A norfloxacin e a ciprofloxacin são fluorquinolonas de segunda geração. Significa que relativamente às de primeira geração apresentam um perfil de actividade mais abrangente no que concerne a bactérias Gram-negativas e a patógenos atípicos, mantendo no entanto uma limitada actividade em bactérias Gram-positivas [1].

São antibióticos inibidores da síntese de ácidos nucleicos, particularmente pela ligação reversível à DNA girase nas bactérias Gram-negativas e topoisomerase IV nas bactérias Gram-positivas apresentando assim, uma actividade bactericida [1,3].

Em termos farmacocinéticos, as fluorquinolonas apresentam uma boa absorção oral, boa difusão nos tecidos, macrófagos e secreções brônquicas, atingindo elevadas concentrações a nível urinário e ósseo. A norfloxacin e a ciprofloxacin sofrem metabolismo hepático e excreção renal [2].

Como indicações terapêuticas, mencionam-se as infecções dos tractos urinário, respiratório, genital, gastrointestinal, do tecido ósseo, articular e dos tecidos moles [1,2].

São geralmente bem toleradas, podendo no entanto verificar-se a ocorrência de perturbações digestivas (como por exemplo náusea), prurido e *rash* cutâneo, fotofobia, tendinites e perturbações neurológicas como confusão e ansiedade [2]. As fluorquinolonas estão contra-indicadas em crianças, adolescentes e grávidas [2].

A resistência bacteriana a estes antibióticos é devida principalmente a dois tipos de mecanismos, resultantes de mutações cromossómicas: (i) alteração nas enzimas alvo; (ii) alteração da acumulação intracelular (alteração de porinas e efluxo por transporte activo) [1].

3.2. Metodologias para a Determinação de Norfloxacin e Ciprofloxacina em Formulações Farmacêuticas

A importância terapêutica das fluorquinolonas levou ao desenvolvimento de várias metodologias para a sua determinação em formulações farmacêuticas. Estas metodologias incluem técnicas como a espectrofotometria, cromatografia, quimioluminescência, espectrofluorimetria, voltametria, potenciometria, polarografia, espectrofotometria de absorção atómica com atomização em chama, electroforese capilar e imunoensaio [3-8].

No que diz respeito à técnica usada, a espectrofotometria constituiu-se como a técnica a que mais se recorre para a determinação de fluorquinolonas em formulações farmacêuticas, devido à sua simplicidade, custo reduzido e distribuição comum em laboratórios de controlo de qualidade [9]. No artigo de Kaur *et al.* de 2008 [3], é feita uma revisão dos métodos para determinação espectrofotométrica de fluorquinolonas e suas aplicações.

No que concerne ao tipo de análise (descontínua ou contínua), refira-se que nas metodologias de análise descontínua, a qualidade e eficiência da análise depende em larga medida da fase de manipulação da amostra. É de destacar ainda a baixa precisão, a necessidade de volumes elevados de amostra e um elevado tempo dedicado pelo operador à execução da análise.

A automatização dos métodos de análise através da implementação dos procedimentos analíticos em sistemas de fluxo proporciona a obtenção de resultados mais exactos e precisos, tornando as determinações mais rápidas e económicas.

De entre as metodologias de fluxo o FIA, já referido na introdução desta dissertação, tem sido largamente usado na automatização de procedimentos analíticos, devido à simplicidade e versatilidade para adaptação a diferentes objectivos, com menores consumos de amostra e reagente assim como uma elevada frequência de amostragem, relativamente ao sistema descontínuo.

Considerando as implementações feitas em sistemas de fluxo, foram aplicadas à determinação de norfloxacin e ciprofloxacina técnicas espectrofotométricas, baseando-se na reacção de complexação com o Fe (III) em meio ácido, segundo uma metodologia FIA e SIA [7,10-12]. Pascual-Reguera *et al.* [7] desenvolveram um método analítico para determinação de ciprofloxacina baseado em SPS-FIA monocal (espectrofotometria em fase sólida-FIA), onde se integraram vários processos analíticos: retenção/separação, pré-concentração e detecção. O procedimento foi efectuado sem recurso a derivatização, o que implica que houve um aproveitamento da absorvância intrínseca do analito na região UV. A pré-concentração da espécie de interesse foi feita simultaneamente com a medição. A resposta foi linear para um intervalo de concentrações de 0,5-10 mg L⁻¹ com um limite de detecção de 0,035 mg L⁻¹ e um ritmo de amostragem de 16 determinações por hora. Sultan *et al.* [10] desenvolveram um sistema FIA para determinação de norfloxacin, recorrendo a uma optimização quimiométrica de parâmetros por estabelecimento de um *design* factorial. Sultan *et al.* [11] desenvolveram também um sistema FIA para determinação de ciprofloxacina, em que foram usados processos de optimização computadorizados, obtendo-se uma resposta linear no intervalo de 50-500 mg L⁻¹, com um volume de amostra de 110 µL e um ritmo de amostragem de 250 h⁻¹. Suliman *et al.* [12] desenvolveram um sistema SIA para determinação de norfloxacin e ciprofloxacina, com optimização feita por estabelecimento de um *design* factorial, com respostas lineares nos intervalos de concentração de 50-400 mg L⁻¹ e 50-500 mg L⁻¹ respectivamente. O volume de amostra gasto rondou os 168 µL.

A reacção de complexação com Fe(III) foi também utilizada para a determinação indirecta de norfloxacin e ciprofloxacina por espectrofotometria de absorção atómica com atomização em chama em que houve uma implementação de um sistema FIA para pré-concentração *on-line* e separação do complexo formado [6,13].

As técnicas quimioluminométricas estão entre as mais divulgadas na determinação de norfloxacin e ciprofloxacina usando o FIA. Assim a norfloxacin pode ser determinada por quimioluminescência com base: na reacção com o Ce(IV) (em que o sulfito actua como sensibilizador sozinho ou em presença de nanopartículas de ouro como catalizador ou ainda com o hipossulfito como sensibilizador) [14-17]; na reacção com um complexo de Ag (III) [18]; na reacção com o sistema $\text{KMnO}_4\text{-Na}_2\text{SO}_4$ e o Tb^{3+} como sensibilizador [8]; no aumento da intensidade de emissão quimioluminométrica entre o luminol e o oxigénio dissolvido [19].

A ciprofloxacina pode ser determinada com base: na reacção com o Ce(IV) em que o Tb^{3+} funciona como sensibilizador [20]; na reacção com o sistema $\text{KMnO}_4\text{-Na}_2\text{SO}_4$ [21]; na reacção com o sistema $\text{KMnO}_4\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ em que o Tb^{3+} funciona como sensibilizador [22]; na reacção com o tris(2,2'-bipiridil)ruténio(II) por electroquimioluminescência [23].

Tanto a norfloxacin como a ciprofloxacina podem ser determinadas com base: na reacção com o Ce(IV) [24]; na reacção com o tris(2,2'-bipiridil)ruténio(II) e o Ce(IV) [25]; na reacção com o ácido peroxinitroso [26]; na reacção com uma solução de Mn(IV) e uma solução de sulfito de sódio [27,28] e ainda o sistema luminol- $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ por electroquimioluminescência [29].

3.3. Referências Bibliográficas

[1] FERREIRA, Wanda ; SOUSA, João – **Microbiologia: Volume 1**. Lidel, Edições Técnicas, 1998.

[2] **Martindale : The complete drug reference**, 33rd Ed., Pharmaceutical Press, 2002.

- [3] KAUR, K. ; KUMAR, A. ; MALIK, A. ; SINGH, B. ; RAO, A. – Spectrophotometric methods for the determination of fluoroquinolones : A review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. 38 (2008) 2-18.
- [4] HUANG, K. ; XU, C. ; XIE, W. – Electrochemical behaviour of norfloxacin and its determination at poly(methyl red) film coated glassy carbon electrode. **Bulletin of the Korean Chemical Society**. 29 (2008) 988-992.
- [5] ABULKIBASH, A. ; SULTAN, S. ; AL-OLYAN, A. ; AL-GANNAM, S. – Differential electrolytic potentiometric titration method for the determination of ciprofloxacin in drug formulations. **Talanta**. 61 (2003) 239-244.
- [6] ZHANG, Z. ; JIANG, Y. ; YAN, H. – Indirect determination of ciprofloxacin by flow injection flame AAS based on forming complex with Fe(III). **Atomic Spectroscopy**. 24 (2003) 27-30.
- [7] PASCUAL-REGUERA, M. ; PARRAS, G. ; DÍAZ, A. – A single spectroscopic flow-through sensing device for determination of ciprofloxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 35 (2004) 689-695.
- [8] JEON, C. ; KHAN, M. ; LEE, S. ; KARIM, M. ; LEE, H. ; SUH, Y. ; ALAM, S. ; CHUNG, H. – Optical flow-through sensor for the determination of norfloxacin based on emission of $\text{KMnO}_4\text{--Na}_2\text{SO}_3\text{--Tb}^{3+}$ system. **Journal of Fluorescence**. 18 (2008) 843-851.
- [9] ASKAL, H. ; REFAAT, I. ; DARWISH, I. ; MARZOUQ, M. – Evaluation of N-Bromosuccinimide as a new analytical reagent for the spectrophotometric determination of fluorquinolone antibiotics. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. 55 (2007) 1551-1556.
- [10] SULTAN, S. ; SULIMAN, F. – Chemometric optimization and flow-injection method for the determination of norfloxacin in drug formulations. **Analyst**. 118 (1993) 573-576.

- [11] SULTAN, S. ; SULIMAN, F. – Flow injection spectrophotometric determination of antibiotic ciprofloxacin in drug formulations. **Analyst**. 117 (1992) 1523-1526.
- [12] SULIMAN, F. ; SULTAN, S. – Sequential injection technique employed for stoichiometric studies, optimization and quantitative determination of some fluoroquinolone antibiotics complexed with iron III in sulphuric acid media. **Talanta**. 43 (1996) 559-568.
- [13] ZHANG, Z. ; JIANG, Y. – Flow injection flame atomic absorption spectrometry for the indirect analysis of norfloxacin. **Atomic Spectroscopy**. 22 (2001) 429-432.
- [14] XIE, Z. ; LIAO, S. ; CHEN, G. – A study on the micelle-sensitized Ce(IV) - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ - norfloxacin chemiluminescence system and its applications. **Luminescence**. 20 (2005) 220-225.
- [15] YU, X. ; BAO, J. – Determination of norfloxacin using gold nanoparticles catalyzed cerium(IV) - sodium sulfite chemiluminescence. **Journal of Luminescence**. 129 (2009) 973-978.
- [16] LIAO, S. ; XIE, Z. – Determination of norfloxacin by flow-injection chemiluminescence. **Spectroscopy and Spectral Analysis**. 25 (2005) 1938-1942.
- [17] SUN, H. ; LI, L. ; CHEN X. ; SHI, H. ; LU, Y. – Determination of norfloxacin by flow-injection analysis with chemiluminescence detection. **Canadian Journal of Analytic Sciences and Spectroscopy**. 51 (2006) 100-107.
- [18] SUN, H. ; CHEN, P. ; WANG, F. – A novel chemiluminescence reaction system for the determination of norfloxacin with Ag(III) complex. **Spectrochimica Acta Part A**. 74 (2009) 819-824.

- [19] SHAO, X. ; LIU, H. ; GAO, X. ; CHEN, W. ; SONG, Z. – Determination of norfloxacin in pharmaceuticals, human serum, and urine using a luminol-dissolved oxygen chemiluminescence system. **Chemical Papers**. 61 (2007) 353-358.
- [20] LIAN, N. ; WANG, J. ; LENG, W. ; CHANG, X. – Flow injection analysis of Ciprofloxacin by terbium sensitized chemiluminescence method. **Spectroscopy and Spectral Analysis**. 25 (2005) 1038-1041.
- [21] SUN, H. ; LI, L. ; CHEN, X. – Flow-injection enhanced chemiluminescence method for determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 384 (2006) 1314-1319.
- [22] ZHANG, Z. ; LI, X. ; WANG, X. ; CHEN, S. ; SONG, B. ; ZHAO, H. - Determination of ciprofloxacin by flow injection analysis based on chemiluminescence system. **Journal of Rare Earths**. 24 (2006) 285-288.
- [23] BURKHEAD, M. ; WANG, H. ; FALLET, M. ; GROSS, E. – Electrogenerated chemiluminescence : An oxidative-reductive mechanism between quinolone antibiotics and tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II). **Analytica Chimica Acta**. 613 (2008) 152-162.
- [24] RAO, Y. ; TONG, Y. ; ZHANG X. ; LUO, G. ; BAEYENS, W. – Flow-injection chemiluminescence determination of fluorquinolones. **Analytical Letters**. 33 (2000) 1117-1129.
- [25] ALY, F. ; AI-TAMIMI, S. ; ALWARTHAN, A. – Chemiluminescence determination of some fluorquinolone derivatives in pharmaceutical formulations and biological fluids using [Ru(bipy)(2)(+)(3)]-Ce(IV) system. **Talanta**. 53 (2001) 885-893.

[26] LIANG, W. ; SONG, J. ; YANG, X. – Flow-injection chemiluminescence determination of fluorquinolones by enhancement of weak chemiluminescence from peroxynitrous acid. **Analytica Chimica Acta**. 510 (2004) 21-28.

[27] DU, J. ; LI, Y. ; LU, J. – Chemiluminescence determination of fluorquinolone antibiotics using a soluble manganese (IV) - sulphite system. **Luminescence**. 20 (2005) 30-35.

[28] LI, Y. ; LU, J. – Determination of three fluoroquinolone drugs by flow injection chemiluminescence. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. 35 (2007) 743-746.

[29] MA, H. ; ZHENG, X. ; ZHANG, Z. – Flow-injection electrogenerated chemiluminescence determination of fluoroquinolones based on its sensitizing effect. **Luminescence**. 20 (2005) 303-306.

CAPÍTULO 4 : PARTE EXPERIMENTAL

4. Parte Experimental

4.1. Introdução

Neste capítulo são descritos os reagentes, soluções e material empregues ao longo do trabalho. É apresentada a montagem analítica desenvolvida, referindo os instrumentos utilizados, assim como o procedimento experimental realizado.

4.2. Reagentes e Soluções

Os reagentes usados na preparação das soluções eram de qualidade analítica, tendo sido usados sem qualquer tratamento ou purificação adicional.

Na preparação das soluções recorreu-se ao uso de água bi-desionizada, com uma condutividade específica inferior a $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$.

As soluções padrão concentradas de norfloxacin e de ciprofloxacina (1 mg mL^{-1}) foram preparadas procedendo-se à pesagem rigorosa de 100 mg do respectivo sólido (Sigma-Aldrich®) e dissolução em 100 mL de $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente. As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente por diluição rigorosa da solução mais concentrada.

Diariamente, prepararam-se soluções de N-bromosuccinimida (NBS) (Sigma-Aldrich®) de concentração $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, para determinação de norfloxacin e ciprofloxacina respectivamente, através da pesagem rigorosa de 178 mg e 356 mg de NBS e sua dissolução em água bi-desionizada.

As soluções foram sonicadas durante 2 minutos e armazenadas ao abrigo da luz, a uma temperatura não superior a 4°C .

A metodologia desenvolvida foi aplicada à análise de diferentes formulações farmacêuticas contendo norfloxacin ou ciprofloxacina disponíveis no mercado português. Assim, as formulações farmacêuticas analisadas contendo norfloxacin foram: Uroflox® (BIAL), Noroxim® (Merck Sharp & Dohme), Norfloxacin Ratiopharm MG, Norfloxacin Cinfa MG, Chibroxol®

(Thea Laboratórios) e as formulações farmacêuticas analisadas contendo ciprofloxacina foram: Nixim[®] (Mepha), Ciprofloxacina Mylan MG, Ciproxina[®] (Bayer Schering Pharma), Ciplox[®] (Cipan), Nivoflox[®] (Grünenthal, SA), Ciprofloxacina suspensão oral (Generis), Oftacilox[®] (Alcon).

A preparação das amostras variou consoante o tipo de formulação farmacêutica.

Na análise de soluções oftálmicas, foi diluído de forma rigorosa um volume de amostra em HCl 0,1 ou 0,01 mol L⁻¹ (norfloxacina ou ciprofloxacina respectivamente) de modo a obter uma concentração final de 40 mg L⁻¹.

Na análise de suspensões orais, foi pesada e dissolvida em HCl 0,01 mol L⁻¹ de forma rigorosa, uma quantidade de amostra de modo a obter uma concentração final de 20 mg L⁻¹.

Na análise de cápsulas e comprimidos, o conteúdo de 10 unidades foi pesado e pulverizado em almofariz de porcelana. Procedeu-se ao cálculo da quantidade correspondente à massa média de uma unidade de cada formulação e dissolveu-se uma quantidade de massa de amostra que permitia obter uma concentração final de 20 ou 10 mg L⁻¹ de norfloxacina e ciprofloxacina, respectivamente.

Todas as soluções de amostras preparadas foram sonicadas durante 5 minutos e filtradas por intermédio de filtros de acetato de celulose Whatman[®] de 0,45 µm de diâmetro de poro.

4.3. Instrumentação

No trabalho desenvolvido foi utilizado material de vidro de Classe A, a pesagem de sólidos era efectuada em balança analítica Mettler Toledo, modelo AG285 com sensibilidade de 1x10⁻⁵ g, e para a medição de volumes inferiores a 5000 µL, utilizaram-se micropipetas automáticas de volumes reguláveis Labmate HTL, modelos LM100, LM1000 e LM5000, com capacidades máximas de 100, 1000 e 5000 µL, respectivamente.

Os espectros de absorção molecular dos compostos foram obtidos usando um espectrofotómetro de UV/Vis de feixe duplo, da marca Perkin Elmer, modelo Lambda 45.

As determinações cromatográficas, utilizadas como método de referência, foram realizadas num cromatógrafo da marca Jasco, equipado com um detector MD-2015 Plus, uma bomba PU-2080 Plus, uma interface LC-Net II/ADC e *software* ChromNav. Neste equipamento foram usadas colunas Kromasil C18 (250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno e com partículas de diâmetro 5 µm).

Quando necessário, o pH das soluções usadas foi medido num milivoltímetro Crison, modelo GLP 22, equipado com um eléctrodo de vidro combinado de AgCl/Ag e solução de KCl 3 mol L⁻¹ saturada com AgCl da marca Crison, modelo 52-02.

4.4. Componentes do Sistema de Fluxo Multi-Impulsão

O desenvolvimento da metodologia analítica proposta para a análise de norfloxacin e ciprofloxacina baseou-se na implementação de um sistema de fluxo multi-impulsão, que compreendeu a existência de micro-bombas solenóides (Figura 4.4.1), de um espectrofotómetro e de um sistema de controlo como elementos básicos do sistema.



Figura 4.4.1. Micro-bomba solenóide da Bio-Chem Valve Inc [1].

Foram usadas micro-bombas solenóides da marca Bio-Chem Valve Inc., modelo 120SP, com um volume de pulso de 10 µL, configuração cilíndrica e reduzidas dimensões (2,5 cm de diâmetro, 6,4 cm de altura, 140 g de peso). De entre as suas características destacam-se: (i) reduzido volume interno (105 µL); (ii) elevada precisão dos volumes dispensados (variação de cerca de 4%); (iii) elevado tempo de vida, podendo atingir 20 milhões de ciclos; (iv) elevada

resistência química, uma vez que usam materiais inertes como o sulfureto de polifenileno (PPS) e monómero de etileno-propileno-dieno (EPDM).

As micro-bombas solenóides eram operadas a 12V, gerando pressões de funcionamento de 5 psi (0,35 bar), com um mínimo de tempo em ON de 150 ms e um mínimo de tempo em OFF de 350 ms e podendo atingir frequências de pulso de 2,0 Hz (120 ciclos min^{-1}).

O funcionamento das micro-bombas baseia-se no deslocamento de um diafragma por acção de um solenóide. Na posição de repouso o diafragma da bomba encontra-se na posição fechada. Aquando da aplicação de voltagem, o solenóide é activado, puxando o diafragma e permitindo que o fluído entre na câmara da bomba. Quando a voltagem é retirada, o solenóide é desactivado, voltando à sua posição inicial e desta forma forçando o diafragma de volta à posição fechada, dispensando o fluído que se encontra no interior da câmara.

De modo a estabelecer a ligação entre os diferentes componentes do sistema de fluxo, utilizou-se tubagem de politetrafluoretileno da marca Omnifit[®] com diâmetro interno de 0,8 mm.

A geometria dos reactores foi estabelecida por enrolamento helicoidal de tubagens sobre uma malha de plástico, de modo a reforçar a componente de transporte radial.

Foi usada uma confluência de construção laboratorial, fabricada em perspex, com configuração em “Y”.

Nas montagens de fluxo desenvolvidas, o dispositivo usado para detecção foi um espectrofotómetro Jenway 6300 equipado com uma célula de fluxo em U da marca Hellma, com volume interno de 18 μL e 1 cm de percurso óptico.

Os sinais analíticos fornecidos pelo espectrofotómetro eram registados em papel, através de um registador Kipp & Zonen, com o registo feito a 1V, a uma velocidade de 2 mm min^{-1} .

Como sistema de controlo do equipamento foi utilizado um microcomputador Pentium que comunicava com os diversos componentes do sistema através de uma interface PCL-711B, da marca Advantech.

A actuação das micro-bombas solenóides foi efectuada por uma interface electrónica de construção própria, usando uma unidade de potência baseada num circuito Cooldrive[™] (NRResearch Inc.).

O *software* utilizado para controlo do sistema foi escrito em linguagem Quickbasic 4.5 (Microsoft). Com este programa foi possível colocar em prática a sequência de etapas necessárias à determinação a realizar.

As instruções inseridas no computador permitiram: definir a sequência de activação das bombas, determinando a estratégia de amostragem; definir o número de pulsos veiculados por cada bomba, determinando os volumes de amostra e reagente e definir a frequência de pulso, determinando os caudais.

4.5. Montagem de Fluxo

O sistema de fluxo multi-impulsão desenvolvido para a determinação de norfloxacin e ciprofloxacina em formulações farmacêuticas, apresentado na Figura 4.5.1, era constituído por três micro-bombas solenóides (MB), responsáveis pela inserção e propulsão das soluções envolvidas.

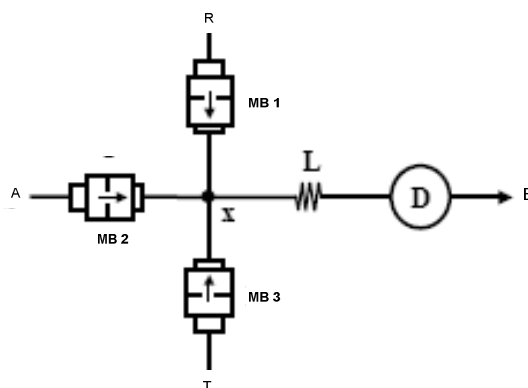


Figura 4.5.1. Representação esquemática da montagem analítica de fluxo multi-impulsão para determinação de norfloxacin e de ciprofloxacina em formulações farmacêuticas. R: reagente (NBS); A: amostra; T: transportador (água); x: confluência; D: detector; MB₁-MB₃: micro-bombas solenóides; L: reactor; E: esgoto. A montagem analítica para determinação de norfloxacin não inclui (L).

MB₁ era responsável pela inserção da solução de NBS, enquanto MB₂ e MB₃ eram responsáveis pela inserção da amostra e de água desionizada como transportador, respectivamente.

Para a determinação de norfloxacin, o ciclo analítico era constituído por duas fases. Na primeira fase, fez-se actuar alternadamente MB₁ e MB₂,

inserindo-se a solução de NBS e a solução de norfloxacin no percurso analítico segundo a estratégia de amostragem binária. Deste modo, um número definido de pequenas alíquotas de NBS era intercalado com pequenas alíquotas de norfloxacin, no ponto de confluência x, sofrendo uma rápida homogeneização, favorecendo o desenvolvimento da reacção.

Considerando que cada alíquota de amostra intercalada correspondia a um pulso de 10 μL , o volume de amostra foi definido pelo número de pulsos de actuação da MB₂.

Na fase seguinte, apenas a MB₃, responsável pela inserção de transportador, era activada propulsionando a zona de reacção para o detector, com obtenção do sinal analítico.

Para se efectuar a determinação de ciprofloxacina, as micro-bombas MB₁ e MB₂ foram activadas simultaneamente, inserindo a solução de NBS e a solução de ciprofloxacina por confluência de zonas, misturando-se rapidamente pela acção dos pulsos resultantes da actuação das micro-bombas.

Posteriormente, por activação da MB₃, a zona reaccional era transportada para detecção, através do reactor L, aumentando o tempo de reacção entre NBS e a ciprofloxacina, favorecendo a formação do composto corado. A passagem da zona de amostra pelo detector originava um sinal analítico transiente que era registado como um pico.

4.6. Optimização e Avaliação da Montagem de Fluxo

No desenvolvimento e optimização do sistema apresentado, foram tidos em conta parâmetros como a sensibilidade, precisão, exactidão, ritmo de amostragem e consumo de reagentes. O estudo de optimização da metodologia de fluxo multi-impulsão implementada foi efectuado com base numa análise univariante que consiste em fazer variar num determinado intervalo, o parâmetro a optimizar mantendo todos os outros parâmetros fixos.

O intervalo de concentrações em que se verificava uma relação linear entre a concentração da espécie e a medida a efectuar, era determinado através do traçado de curvas de calibração, com soluções de concentração crescente da espécie a determinar e pelo estabelecimento do intervalo de

concentrações no qual se observava uma relação linear do sinal analítico com a concentração de analito.

As concentrações das espécies farmacêuticas analisadas foram obtidas em função da amplitude dos sinais analíticos originados, registados em unidades de absorvância (UA). A intensidade de cada sinal foi calculada em função da média de três determinações obtidas por inserção consecutiva da mesma amostra. A concentração final de cada espécie analisada foi calculada por interpolação gráfica, na curva de calibração estabelecida segundo o método dos mínimos quadrados, para cada determinação.

O limite de detecção (valor mínimo de concentração que pode ser determinado com certeza isto é, com precisão e exactidão aceitáveis pelo método desenvolvido) foi calculado de acordo com as especificações da IUPAC [2] e em concordância com o item 6.3 da *guideline* Q2 da ICH, a partir dos sinais analíticos de dez determinações consecutivas de branco. O limite de quantificação (valor mínimo que pode ser quantificado com certeza pelo método desenvolvido) foi calculado de acordo com as especificações da IUPAC [2] e em concordância com o item 7.3 da *guideline* Q2 da ICH, a partir dos sinais analíticos de dez determinações consecutivas de branco.

O ritmo de amostragem, expresso em número de determinações por hora, foi calculado com base no tempo necessário para a realização de um ciclo analítico.

A precisão da metodologia que pretende avaliar a dispersão de resultados foi expressa em termos de repetibilidade. Para este efeito foram realizadas 10 determinações consecutivas de uma amostra, com um valor de concentração situado aproximadamente a meio da zona de linearidade, tendo sido determinado o desvio padrão relativo.

A exactidão da metodologia proposta foi avaliada por comparação dos resultados obtidos com os fornecidos pela metodologia de referência. Aos resultados da análise pelos métodos propostos e de comparação, encontra-se associado o desvio padrão de três determinações (Resultado \pm Desvio Padrão). Para cada determinação calcularam-se os desvios relativos para cada par de resultados obtidos (DR%) com base na expressão $(C_{\text{fluxo}} - C_{\text{ref}}) \times 100 / C_{\text{ref}}$.

Para garantir uma avaliação mais sistemática dos resultados, foi aplicado um teste de significância, o teste t , que ao comparar valores médios, permite revelar as diferenças não passíveis de acontecer por simples variação aleatória [3,4]. O valor de t foi calculado com base na expressão $t = X/S \cdot n^{1/2}$, com $n-1$ graus de liberdade e onde X corresponde à média da diferença entre cada par de valores, S é o desvio padrão e n o número de medidas.

O valor calculado ($t_{\text{calculado}}$) quando comparado com o valor tabelado (t_{tabelado}), para um nível de significância de 95%, permite confirmar a concordância entre os dois métodos quando se verifica a hipótese nula isto é, quando é verdadeira a afirmação “ não existe diferença entre as duas médias” [3,4].

4.7. Metodologia de Referência

A validação da metodologia de fluxo por multi-impulsão desenvolvida foi efectuada por comparação dos resultados obtidos com os resultados obtidos pela metodologia de referência preconizada na Farmacopeia Britânica [5-7].

Assim, as formulações farmacêuticas contendo norfloxacin ou ciprofloxacina foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A preparação das soluções de amostra de norfloxacin foi efectuada por pesagem e pulverização em almofariz de porcelana de 20 comprimidos de cada formulação farmacêutica analisada. Através do cálculo da quantidade correspondente à massa média de uma unidade de cada formulação, determinou-se a quantidade de amostra equivalente a 0,1 g de norfloxacin, a qual foi dissolvida na fase móvel que era constituída por 150 volumes de acetonitrilo e 850 volumes de uma solução de ácido orto-fosfórico 0,1% (v/v). A solução obtida foi filtrada e analisada por HPLC.

No caso da solução oftálmica, a solução de amostra foi preparada por diluição do volume referente a 0,1 g de norfloxacin na fase móvel, seguindo-se o mesmo procedimento realizado para as formulações farmacêuticas sólidas.

Antes de iniciar as determinações, procedeu-se ao pré-acondicionamento da coluna de cromatografia, usando uma solução de dihidrogenofosfato de sódio anidro $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado a pH 4,0 com ácido orto-fosfórico, a um caudal de $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ durante 8 h.

A detecção de norfloxacinina era efectuada por determinação da absorvância a 275 nm.

A preparação das soluções de amostra de ciprofloxacina foi efectuada por pesagem e pulverização em almofariz de porcelana de 20 comprimidos (ou do conteúdo de 20 cápsulas) de cada formulação farmacêutica analisada. Através do cálculo da quantidade correspondente à massa média de uma unidade de cada formulação, determinou-se a quantidade de amostra equivalente a 2 g de ciprofloxacina, a qual foi dissolvida na fase móvel que era constituída por 13 volumes de acetonitrilo e 87 volumes de uma solução de ácido orto-fosfórico 0,245% (m/v) com ajuste de pH a 3,0 com trietilamina.

A solução obtida foi filtrada e diluída em fase móvel de modo a originar uma solução contendo o equivalente a 0,05% (m/v) de ciprofloxacina e posteriormente analisada por HPLC.

No caso da suspensão oral, a solução de amostra foi preparada por pesagem de uma massa correspondente a 2 g de ciprofloxacina e dissolução na fase móvel, seguindo-se o mesmo procedimento realizado para as formulações farmacêuticas sólidas.

A detecção de ciprofloxacina era efectuada por determinação da absorvância a 278 nm.

4.8. Referências Bibliográficas

[1] Disponível na WWW: <URL:<http://www.biochem.com> [Consultado 13 Novembro 2009].

[2] CURRIE, L. ; SVEHLA, G. – Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis. **Pure and Applied Chemistry**. 3 (1994) 595-608.

[3] BURKE, S. – Understanding the structure of scientific data. **LCGC Europe**. (2001) 3-8.

[4] MILLER, J. ; MILLER, J. – **Estatística para química analítica**. Delaware, EUA : Addison-Wesley, Iberoamericana, 1998.

[5] Monografia “Norfloxacin tablets”, **British Pharmacopoeia**. 2005, p 2683.

[6] Monografia “Norfloxacin Eye Drops”, **British Pharmacopoeia**. 2005, p 2682.

[7] Monografia “Ciprofloxacin tablets”, **British Pharmacopoeia**. 2005, p 2334, 2335.

CAPÍTULO 5 : RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e Discussão

5.1. Introdução

A metodologia de fluxo multi-impulsão desenvolvida com o intuito de determinar quantitativamente norfloxacin e ciprofloxacina em formulações farmacêuticas, baseia-se na oxidação das moléculas em causa pela N-Bromosuccinimida (NBS) em meio ácido, formando-se um produto de cor amarela.

A NBS é um reagente comumente usado nas determinações espectrofotométricas de muitos compostos farmacêuticos por oxidação ou bromação desses mesmos compostos [1-6].

Refira-se em particular o artigo de Askal *et al.* [5] dedicado à avaliação da NBS como um reagente para determinação espectrofotométrica indirecta de fluorquinolonas, em que se fez reagir 11 fluorquinolonas com NBS e o excesso de NBS reagiu por sua vez com p-fenilenediamina (PDA), dando origem a um composto de cor violeta que absorvia a 530 nm assim como o artigo de Al-Momani *et al.* [7] que explora a determinação espectrofotométrica de levofloxacin em comprimidos e urina usando um sistema de análise por injeção de fluxo. Neste último artigo, é proposta uma montagem analítica FIA de dois canais, em que a amostra é introduzida por intermédio de uma válvula de injeção e misturada com uma solução tampão a nível do primeiro reactor de mistura. Através de uma confluência localizada posteriormente ao primeiro reactor, refere-se a adição de NBS para um segundo reactor. Foi usado um volume de amostra de 60 µL e a absorvância do produto de reacção colorido foi monitorizada a 440nm. Os caudais usados para as soluções foram de 0,60 mL min⁻¹. No caso em que a amostra era urina foi calculada a eficiência de extracção através do rácio entre a quantidade extraída de uma urina com quantidades conhecidas de levofloxacin e as quantidades adicionadas na mesma concentração a um tampão fosfato (pH = 3,2) antes da injeção.

Dependendo do pH do meio, a NBS pode fornecer diferentes tipos de espécies reactivas responsáveis pela oxidação dos substratos [6]. Tendo em consideração as condições de meio ácido seleccionadas para a reacção entre

fluorquinolonas e NBS, com prováveis espécies de NBS a serem formadas (RN^+HBr ou $RNH+Br^+$) [6] assim como a estequiometria proposta para a mesma (1 mol fluorquinolona : 2 mol NBS) é possível inferir a estrutura química dos produtos reaccionais, de que se refere o exemplo da norfloxacinina (Figura 5.1.1) [5].

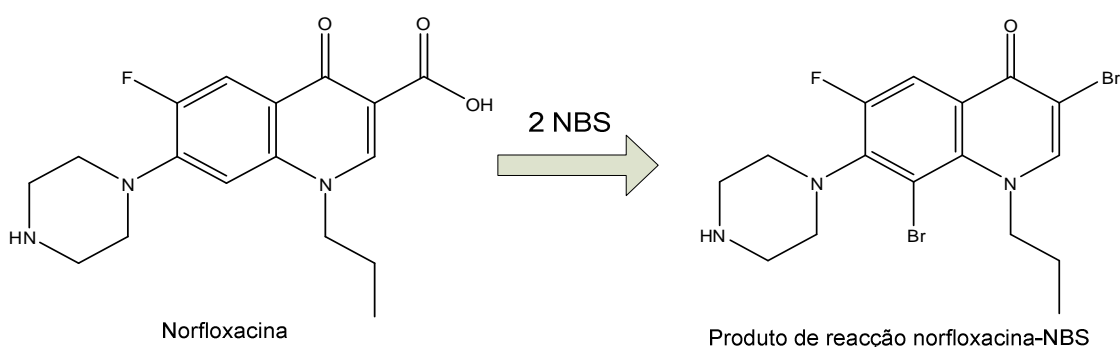


Figura 5.1.1. Esquema representativo da proposta de produto reaccional obtido entre norfloxacinina e NBS.

Com o objectivo de definir o comprimento de onda no qual o produto corado formado apresentasse um máximo de absorção, realizou-se um ensaio em método discreto, em que se adicionou NBS 890 mg L^{-1} a norfloxacinina ou ciprofloxacina 20 mg L^{-1} .

Foram traçados os espectros de absorção molecular destas soluções cujo máximo de absorvância corresponde a um valor entre 380 e 385 nm (ciprofloxacina e norfloxacinina respectivamente).

Na realização do procedimento em sistema de fluxo foi seleccionado o valor de comprimento de onda de 420 nm como um compromisso entre selectividade e sensibilidade. Apesar do máximo de absorvância ser entre 380 e 385 nm, nestes comprimentos de onda há interferência de vários compostos que estão normalmente presentes nas formulações farmacêuticas, daí a opção por 420 nm em que se tentou obter a máxima sensibilidade com uma maior selectividade.

5.2. Optimização do Sistema de Fluxo

Com a finalidade de otimizar a metodologia automática implementada, foi estudada a influência dos parâmetros físico-químicos no sinal analítico (absorvância). As condições experimentais foram definidas por optimização de volume e concentração de amostra e reagente, caudal, comprimento do reactor e temperatura.

5.2.1. Estratégia de Amostragem e Volumes de Amostra e Reagente

A versatilidade da manipulação da amostra que caracteriza os sistemas de fluxo multi-impulsão permite a implementação de diferentes abordagens para a introdução de amostra e reagentes, tais como a amostragem binária, a confluência de zonas e volume único. Assim, foram realizados ensaios para avaliar o efeito das diversas estratégias de amostragem na mistura das soluções de norfloxacin e ciprofloxacina com a solução de NBS.

Quando a amostra era norfloxacin os melhores resultados foram obtidos inserindo a amostra usando a estratégia de amostragem binária. Tal como se referiu anteriormente, o conceito de amostragem binária consiste na intercalação de múltiplas alíquotas de ambas as soluções criando múltiplas interfaces de reacção, onde ocorre dispersão, promovendo uma mistura eficiente. A combinação da amostragem binária com o fluxo pulsado criado pelas micro-bombas solenóides promove uma homogeneização ainda mais rápida e eficiente, favorecendo o desenvolvimento da reacção.

Quando a amostra era ciprofloxacina os sinais analíticos obtidos usando confluência de zonas foram ligeiramente superiores aos obtidos com a estratégia de amostragem binária. Assim, as soluções de ciprofloxacina e NBS foram inseridas no sistema analítico por confluência de zonas demonstrando desta forma, a versatilidade dos sistemas de fluxo multi-impulsão.

Nos sistemas de fluxo multi-impulsão os volumes de amostra e reagente são definidos em termos de número de pulsos de actuação da micro-bomba solenóide, sendo múltiplos do volume de pulso ($10 \times n$ pulsos).

A avaliação da influência do volume de amostra na determinação foi efectuada estudando volumes no intervalo de 20 a 140 μL que corresponde a um número de pulsos de amostra de 2 a 14.

Verificou-se que para a norfloxacin (Figura 5.2.1.1) os sinais analíticos aumentavam progressivamente com o aumento do número de pulsos, atingindo um valor mais elevado para um volume de amostra de 120 μL (12 pulsos).

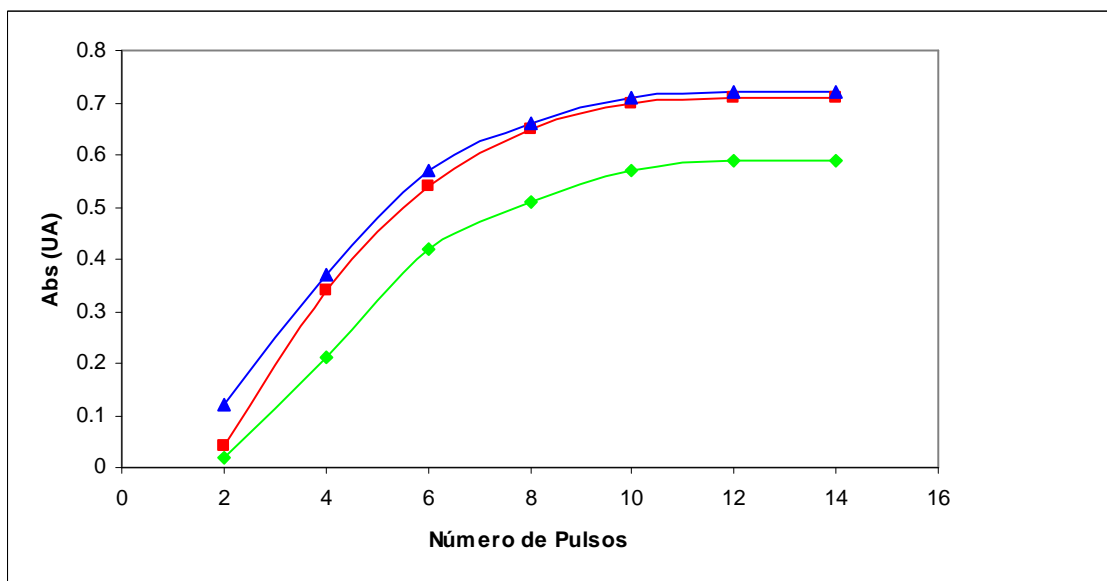


Figura 5.2.1.1. Influência do número de pulsos introduzidos segundo a estratégia de amostragem binária no sinal analítico obtido. Verde: norfloxacin 20 mg L⁻¹; Vermelho: norfloxacin 40 mg L⁻¹; Azul: norfloxacin 60 mg L⁻¹.

Quando a amostra utilizada era a ciprofloxacina (Figura 5.2.1.2) observou-se um aumento dos sinais analíticos até um volume de amostra de 100 μL (10 pulsos) com estabilização posterior a esse valor.

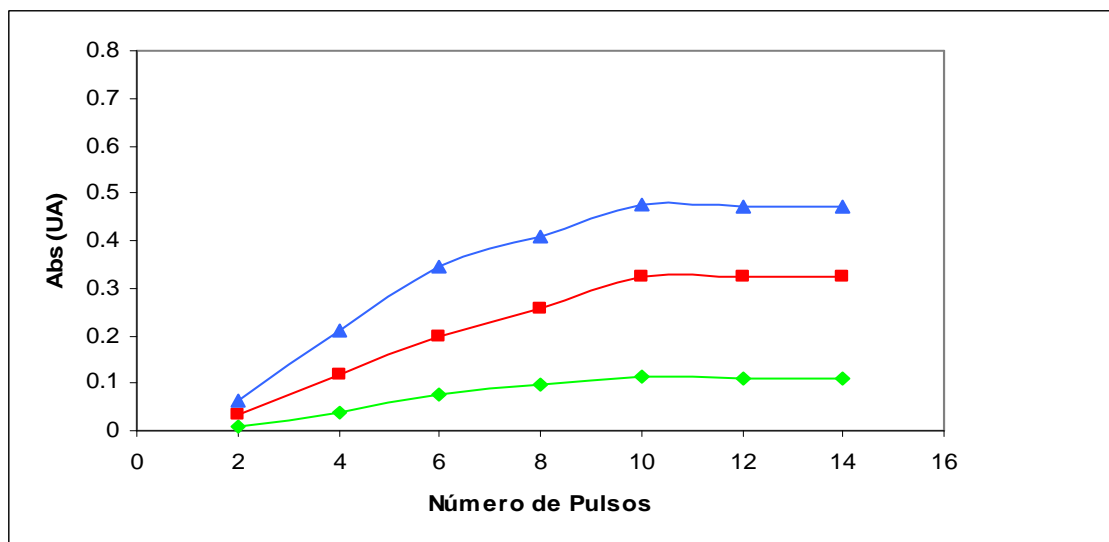


Figura 5.2.1.2. Influência do número de pulsos introduzidos segundo a estratégia de confluência de zonas no sinal analítico obtido. Verde: ciprofloxacina 20 mg L⁻¹; Vermelho: ciprofloxacina 40 mg L⁻¹; Azul: ciprofloxacina 60 mg L⁻¹.

Assim, para prosseguir a optimização da montagem analítica foi fixado um volume de amostra de 120 µL e 100 µL para norfloxacin e ciprofloxacina, respectivamente.

5.2.2. Dimensão do Reactor

O comprimento do reactor é um parâmetro importante a optimizar, uma vez que influencia significativamente a dispersão e homogeneização da zona reaccional. Além disso, o comprimento do reactor em conjunto com o caudal determinam o tempo disponível para a reacção.

Foi avaliada a influência de um reactor e do seu comprimento (25, 50, 75, 100 cm) na dispersão da zona de reacção e no tempo de reacção, variando a ligação entre a confluência X e o detector.

Uma vez que as reacções da norfloxacin e da ciprofloxacina com NBS exibem diferentes cinéticas, o efeito do comprimento do reactor no sinal analítico foi diferente para cada um dos compostos.

Quando a amostra era a norfloxacin verificou-se que o sinal analítico não sofria alteração com o aumento do comprimento do reactor. Tendo em

consideração que se recorre à amostragem binária para promover a mistura de amostra e reagente e que o fluxo pulsado também contribui para essa mistura, a reacção é rápida o suficiente para se prescindir da utilização de um reactor para efeitos de modulação do tempo de reacção. Nesse sentido, na continuidade do processo de optimização, foi escolhida a situação de ausência de reactor no percurso analítico, usando-se apenas uma tubagem com o comprimento mínimo para ligar a confluência ao detector (10 cm).

Na reacção da ciprofloxacina com NBS verificou-se um aumento do sinal analítico com o aumento do comprimento do reactor até 75 cm e depois decrescia ligeiramente quando se utilizava um reactor de 100 cm (Figura 5.2.2.1). Uma vez que a cinética da reacção da ciprofloxacina é mais lenta, o aumento do comprimento do reactor resulta num aumento do tempo de reacção, favorecendo o desenvolvimento da mesma. A diminuição do sinal analítico observada para o reactor de 100 cm era causada pela dispersão da amostra durante o percurso até ao detector. Seleccionou-se então um reactor de 75 cm para prosseguir os estudos da ciprofloxacina.

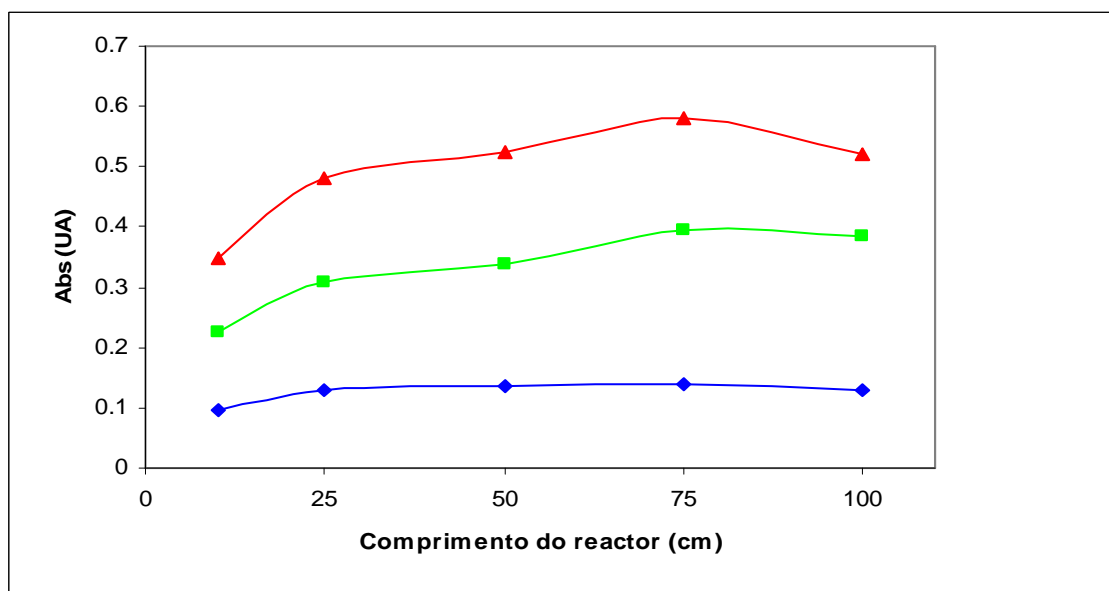


Figura 5.2.2.1. Influência do comprimento do reactor no sinal analítico obtido. Azul: ciprofloxacina 5 mg L⁻¹; Verde: ciprofloxacina 20 mg L⁻¹; Vermelho: ciprofloxacina 50 mg L⁻¹.

5.2.3. Caudal

O estudo da influência do caudal no sinal analítico do detector é igualmente crítico para a optimização deste sistema de fluxo, na medida em que é determinante do tempo de permanência das soluções no interior da célula de fluxo, influenciando a intensidade do sinal analítico (sensibilidade) .

Em sistemas de fluxo multi-impulsão, o caudal é determinado pela frequência de actuação e volume de pulso das micro-bombas solenóides.

No sistema de fluxo desenvolvido, o caudal foi controlado em termos de tempo de pulso, definido como a soma dos tempos correspondentes à abertura e fecho de diafragma em cada actuação da micro-bomba solenóide. Considerando que em cada pulso são dispensados 10 μL de solução, foi possível calcular os valores de caudais.

A avaliação do efeito do caudal foi efectuada testando tempos de pulso entre 0,4 e 1,2 s para cada micro-bomba, que correspondem a caudais entre 1,5 e 0,5 mL min^{-1} por solução.

Na determinação da norfloxacin, o sinal analítico manteve-se praticamente inalterado, registando-se apenas um ligeiro aumento para um caudal de 1 mL min^{-1} . Uma vez que a cinética da reacção é rápida e a mistura das soluções por acção do fluxo pulsado é bastante eficiente, a variação do caudal quase não se fez sentir na intensidade do sinal analítico.

Na determinação da ciprofloxacina, verificou-se um aumento da intensidade do sinal analítico com a diminuição do caudal até 0,75 mL min^{-1} (Figura 5.2.3.1). Esta situação explica-se pelo facto de a cinética de formação do produto reaccional entre ciprofloxacina e NBS ser mais lenta que a cinética respeitante à norfloxacin (já inferido aquando da escolha de intercalação no percurso analítico de um reactor de 75 cm) e portanto ser beneficiada por um caudal mais lento, o que favorece um maior tempo de residência.

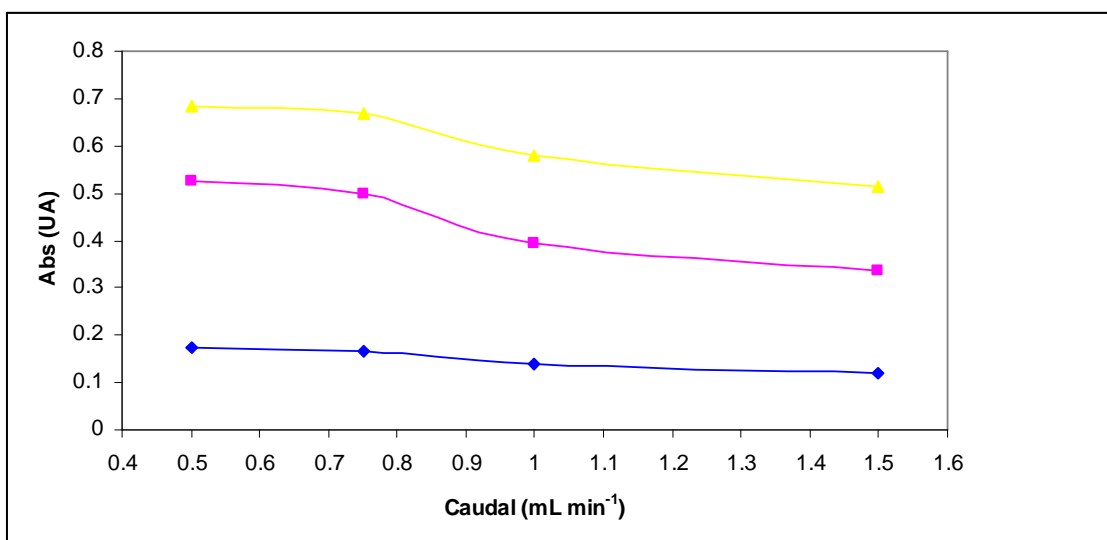


Figura 5.2.3.1. Influência do caudal na intensidade do sinal analítico obtido. Azul: ciprofloxacina 5 mg L⁻¹; Rosa: ciprofloxacina 20 mg L⁻¹; Amarelo: ciprofloxacina 50 mg L⁻¹.

5.2.4. Concentração dos Reagentes

Entre os parâmetros que afectam a intensidade do sinal analítico, encontram-se as concentrações da solução de NBS e da solução de HCl usada para a preparação das soluções de norfloxacin e ciprofloxacina.

Na determinação da norfloxacin, a influência da concentração da solução de NBS foi avaliada para um intervalo de concentrações entre 0,005 mol L⁻¹ e 0,04 mol L⁻¹, verificando-se um aumento da intensidade do sinal analítico até 0,02 mol L⁻¹. Para concentrações superiores de NBS observava-se um comportamento diferente consoante a concentração de norfloxacin (Figura 5.2.4.1).

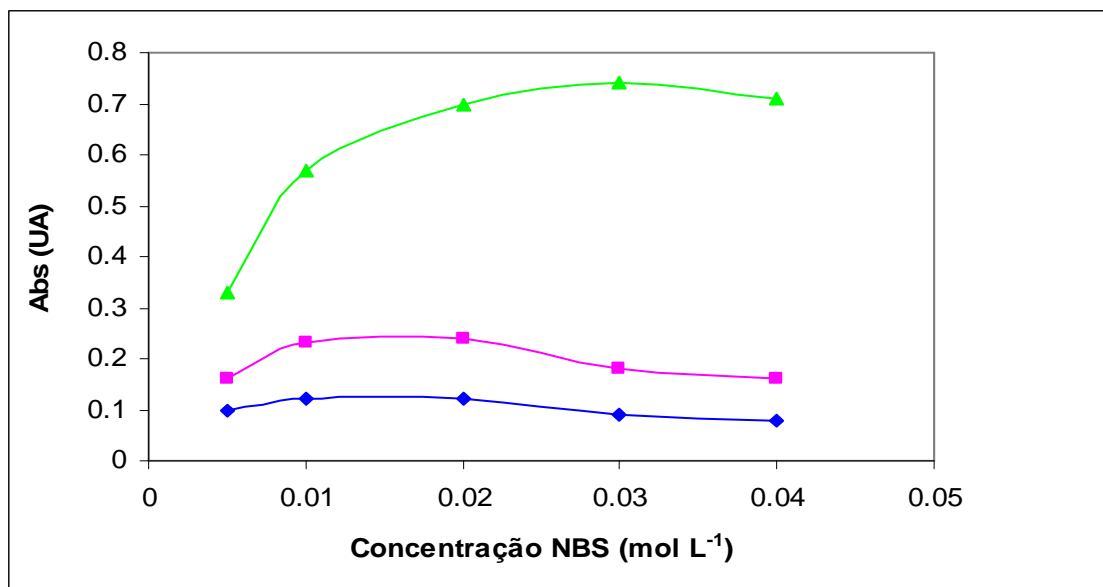


Figura 5.2.4.1. Influência da concentração de NBS no sinal analítico obtido. Azul: norfloxacina 25 mg L⁻¹; Rosa: norfloxacina 50 mg L⁻¹; Verde: norfloxacina 200 mg L⁻¹.

Na gama de concentrações de NBS mais elevada (a partir de 0,02 mol L⁻¹), verificou-se que dois fenómenos distintos ocorriam, consoante se estivesse em presença de concentrações mais baixas ou mais elevadas de norfloxacina. Para a concentração mais elevada de norfloxacina verificou-se uma estabilização do sinal analítico, enquanto que para concentrações mais baixas de norfloxacina, houve um decréscimo da intensidade do sinal analítico, que se justifica pela cinética rápida da reacção.

Na determinação da ciprofloxacina, a influência da concentração da solução de NBS foi avaliada para um intervalo de concentrações entre 0,005 e 0,05 mol L⁻¹, obtendo-se um aumento da intensidade do sinal analítico com o aumento da concentração de NBS até 0,04 mol L⁻¹.

A influência da concentração da solução de HCl usada na preparação das soluções de norfloxacina e ciprofloxacina foi também avaliada no intervalo de concentração entre 0,001 e 0,8 mol L⁻¹, tendo-se obtido um sinal analítico de maior amplitude usando uma concentração de 0,1 mol L⁻¹ para a norfloxacina e 0,01 mol L⁻¹ para a ciprofloxacina.

5.2.5. Temperatura

A influência da temperatura na intensidade do sinal analítico obtido foi estudada para a temperatura ambiente (20°C), 30°C e 40°C.

Tanto para a norfloxacinina como para a ciprofloxacina o aumento da temperatura não aumentou significativamente a intensidade do sinal analítico, tendo sido os ensaios posteriores realizados à temperatura ambiente.

Na Tabela 5.2.5, sintetizam-se as condições experimentais resultantes da optimização efectuada para as montagens analíticas para determinação de norfloxacinina e ciprofloxacina.

Tabela 5.2.5. - Valores optimizados de parâmetros analíticos.

Parâmetros analíticos	Norfloxacinina	Ciprofloxacina
Estratégia de Amostragem	Amostragem binária	Confluência de zonas
Volume amostra	120 µL	100 µL
Volume NBS	120 µL	100 µL
Tamanho reactor	10 cm	75 cm
Caudal	1,0 mL min ⁻¹	0,75 mL min ⁻¹
Concentração NBS	0,02 M	0,04 M
Concentração HCl	0,1 M	0,01 M
Temperatura	20°C	20°C

5.3. Parâmetros de Calibração do Sistema de Fluxo Multi-Impulsão

Concluída a optimização do sistema e utilizando as condições experimentais definidas anteriormente e apresentadas na Tabela 5.2.5 traçaram-se curvas de calibração, obtendo-se uma zona de resposta linear entre 5 e 70 mg L⁻¹, tanto para a norfloxacinina como para a ciprofloxacina (Figura 5.3.1).

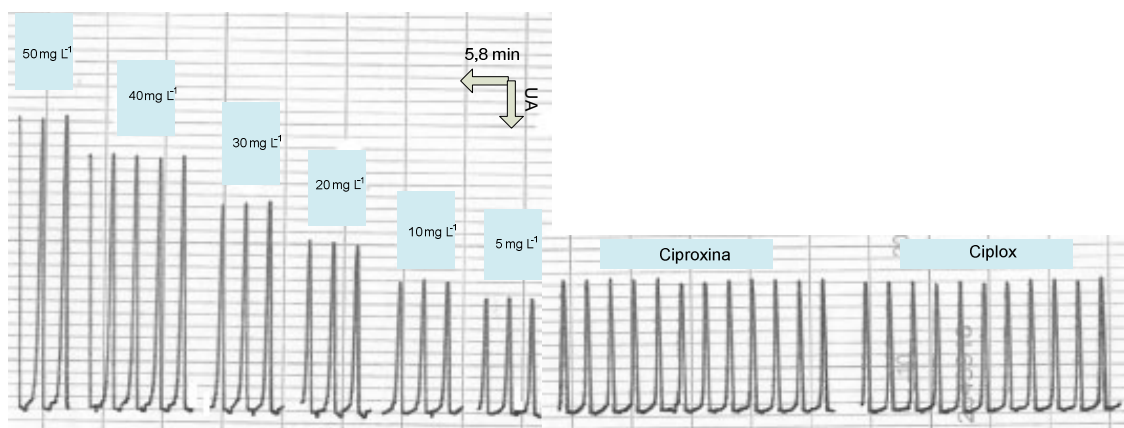


Figura 5.3.1. Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração e análise de formulações farmacêuticas.

Na determinação da norfloxacin, a curva de calibração obtida é representada pela equação $A = 0,0097 (\pm 0,0003) C - 0,0159 (\pm 0,0096)$, em que A corresponde à absorvância registada a 420 nm e C corresponde à concentração de norfloxacin expressa em mg L⁻¹ com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9996.

Na determinação da ciprofloxacina, a recta de calibração obtida é representada pela equação $A = 0,0043 (\pm 0,0001) C - 0,0063 (\pm 0,0032)$, em que A corresponde à absorvância registada a 420 nm e C corresponde à concentração de norfloxacin expressa em mg L⁻¹ com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9998.

Os limites de detecção e de quantificação, calculados como exposto no capítulo 4, eram de 0,27 mg L⁻¹ e de 0,81 mg L⁻¹ para a norfloxacin, enquanto que para a ciprofloxacina eram de 0,99 mg L⁻¹ e de 3 mg L⁻¹.

O ritmo de amostragem (número de determinações por hora) foi calculado com base no tempo necessário para a realização de um ciclo analítico. A metodologia desenvolvida permitia efectuar cerca de 58 e 31 determinações por hora para a norfloxacin e a ciprofloxacina, respectivamente.

5.4. Estudo de Interferentes

Foi efectuado um estudo para avaliar o grau de interferência de alguns excipientes comumente usados nas formulações farmacêuticas, uma vez que

a metodologia desenvolvida iria ser aplicada à determinação de norfloxacin e ciprofloxacina em formulações farmacêuticas.

Analísaram-se soluções contendo uma concentração fixa de norfloxacin de $1,56 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou de ciprofloxacina de $9,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e concentrações crescentes de cada um dos excipientes usados correspondendo a razões molares em relação ao analito de 10, 25, 50 e 100 vezes.

Foi estabelecido o critério de que um composto era considerado interferente sempre que a sua presença provocasse uma variação de sinal analítico para a concentração fixada de analito, superior a 3% quando comparado com o valor obtido na sua ausência.

Os resultados obtidos na avaliação de interferentes na determinação de norfloxacin e de ciprofloxacina são apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Resultados obtidos no estudo de interferentes para a norfloxacin e para a ciprofloxacina. É referida a razão molar para a qual o excipiente já não interfere.

Interferente	Razão Molar	
	Interferente:Norfloxacin	Interferente:Ciprofloxacina
Lactose	50:1	100:1
Estearato de magnésio	25:1	100:1
Dióxido de titânio	100:1	100:1
Celulose microcristalina	100:1	100:1
PVP	10:1	10:1
Cloreto de sódio	100:1	100:1
Fosfato dissódico	100:1	100:1
PEG 6000	100:1	100:1
Cloreto de benzalcónio	100:1	50:1
Glucose	100:1	100:1
Frutose	100:1	100:1
Sacarose	100:1	50:1
Amido de milho	25:1	50:1

Os resultados demonstram que para a determinação de norfloxacin, a lactose não interferia para uma razão molar até 50 (excipiente : norfloxacin), o estearato de magnésio e o amido de milho não interferiam para uma razão molar até 25, enquanto o PVP não interferia para uma razão molar até 10.

Relativamente à determinação de ciprofloxacina, verificou-se que o cloreto de benzalcônio, a sacarose e o amido de milho não interferiam para uma razão molar até 50 (excipiente : ciprofloxacina) enquanto que o PVP não interferia para uma razão molar até 10.

Uma vez que a massa média dos comprimidos de norfloxacin ou de ciprofloxacina é cerca de 1,3 ou 1,5 vezes a massa de analito presente na formulação, nenhum dos excipientes está presente numa concentração capaz de causar interferência.

5.5. Análise de Formulações Farmacêuticas

A metodologia analítica desenvolvida foi aplicada à determinação de norfloxacin e ciprofloxacina em formulações farmacêuticas disponíveis no mercado português. As soluções das diferentes amostras foram preparadas a partir das formulações em estudo, como referido no capítulo 4 desta dissertação e posteriormente analisadas no sistema de fluxo multi-impulsão otimizado.

Os resultados obtidos encontram-se esquematizados nas Tabelas 5.5A e 5.5B apresentando os desvios relativos da metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência. Os desvios relativos (em percentagem) foram calculados e foram sempre inferiores a 3,7% e 2,7% para a análise de formulações farmacêuticas contendo norfloxacin e ciprofloxacina respectivamente.

Tabela 5.5A - Resultados da análise de formulações farmacêuticas contendo norfloxacin.

Formulação farmacêutica	Quantidade declarada (mg/formulação)	Quantidade encontrada (mg/formulação)		Desvio relativo (%)
		Método desenvolvido	Método de referência	
Uroflox (comprimidos)	400	408,20 ± 1,64	407,30 ± 0,13	0,2
Noroxin (comprimidos revestidos)	400	385,72 ± 0,10	387,60 ± 0,13	-0,5
Norfloxacin Ratiopharm (comprimidos revestidos)	400	414,83 ± 0,10	413,81 ± 0,19	0,2
Norfloxacin Cinfa (comprimidos revestidos)	400	394,12 ± 0,10	409,24 ± 0,14	-3,7
Chibroloxol (solução oftálmica)	3 mg mL ⁻¹	3,15 ± 0,10	3,22 ± 0,26	-2,2

Tabela 5.5B - Resultados da análise de formulações farmacêuticas contendo ciprofloxacina.

Formulação farmacêutica	Quantidade declarada (mg/formulação)	Quantidade encontrada (mg/formulação)		Desvio relativo (%)
		Método desenvolvido	Método de referência	
Nivoflox (cápsulas)	500	518,16 ± 18,51	514,08 ± 0,31	0,8
Nixim (comprimidos revestidos)	500	504,81 ± 0,10	518,01 ± 0,30	-2,7
Ciprofloxacina				
Mylan (comprimidos revestidos)	250	247,06 ± 4,63	248,34 ± 0,44	0,6
Ciprofloxacina				
Generis (suspensão oral)	100 mg mL ⁻¹	100,96 ± 0,10	100,80 ± 0,02	0,2
Ciproxina (comprimidos revestidos)	500	524,52 ± 8,39	524,04 ± 0,18	0,1
Ciplox (comprimidos revestidos)	250	262,26 ± 4,20	262,62 ± 0,04	-0,1

A análise repetida (n=10) de soluções de amostra de norfloxacina ou ciprofloxacina de concentração 10 mg L⁻¹ pela metodologia desenvolvida, originou desvios padrão relativos inferiores a 0,9 e 2,2% respectivamente, revelando uma boa repetibilidade.

A realização do teste de *t-Student* emparelhado, para um nível de confiança de 95%, confirmou a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos, uma vez que os valores de $t_{\text{calculado}}$ são inferiores aos valores de t_{tabelado} . Para a análise de formulações farmacêuticas contendo norfloxacina obteve-se um $t_{\text{calculado}}$ de -1,01 que foi comparado com o valor tabelado de 2,13; para a análise de

formulações farmacêuticas contendo ciprofloxacina obteve-se um $t_{\text{calculado}}$ de -0,69 que foi comparado com um valor tabelado de 2,01.

Os resultados obtidos por aplicação da metodologia desenvolvida e da metodologia de referência foram ainda confirmados pelo estabelecimento de uma regressão linear de comparação entre ambas.

No caso da análise de formulações de norfloxacin a regressão linear tem a equação $C_{\text{MI}} = (0,9909 \pm 0,0395) C_{\text{HPLC}} - (0,105 \pm 0,131)$ e no caso da análise de formulações de ciprofloxacina, a regressão linear tem a equação $C_{\text{MI}} = (0,9925 \pm 0,0319) C_{\text{HPLC}} - (0,102 \pm 0,127)$, em que C_{MI} se refere às concentrações obtidas no sistema de fluxo multi-impulsão e C_{HPLC} , se refere às concentrações obtidas no sistema de referência.

Na correlação dos dois métodos, os valores da ordenada na origem e do declive não diferem significativamente de zero (0) e um (1) respectivamente, confirmando a ausência de diferenças estatisticamente significativas.

5.6. Referências Bibliográficas

- [1] ALWARTHAN, A. ; AL-OBAID, A. – Colorimetric determination of astemizole in bulk and in its pharmaceutical dosage forms using flow injection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 14 (1996) 579-582.
- [2] AMIN, A. ; AHMED, I. ; DESSOUKI, H. ; GOUDA, E. – Utility of oxidation-reduction reaction for the determination of ranitidine hydrochloride in pure form, in dosage forms and in the presence of its oxidative degradates. **Spectrochimica Acta Part A**. 59 (2003) 695-703.
- [3] EL-YAZBI, F. ; GAZY, A. ; MAHGOUB, H. ; EL-SAYED, M. ; YOUSSEF, R. – Spectrophotometric and titrimetric determination of nizatidine in capsules. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 31 (2003) 1027-1034.

- [4] GOWDA, B. ; SEETHARAMAPPA, J. ; MELWANKI, M. – Indirect spectrophotometric determination of propranolol hydrochloride and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations. **Analytical Sciences**. 18 (2002) 671-674.
- [5] ASKAL, H. ; REFAAT, I. ; DARWISH, I. ; MARZOUQ, M – Evaluation of N-Bromosuccinimide as a new analytical reagent for the spectrophotometric determination of fluorquinolone antibiotics. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. 11 (2007) 1551-1556.
- [6] BHANDARKAR, P. ; MOHANA, K. – Oxidative cleavage of gabapentin with N-bromosuccinimide in acid medium : A kinetic and mechanistic study. **Indian Journal of Chemistry**. 48A (2009) 1107-1112.
- [7] AL-MOMANI, I. – Flow injection spectrophotometric determination of the antibacterial levofloxacin in tablets and human urine. **Analytical Letters**. 39 (2006) 741-750.

CAPÍTULO 6 : CONCLUSÕES

6. Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia de fluxo por multi-impulsão com detecção espectrofotométrica de norfloxacin e ciprofloxacina que permitiu a implementação de um procedimento analítico simples, económico, versátil, expedito e reproduzível.

O uso de micro-bombas solenóides como único dispositivo activo do sistema, com funções de inserção, propulsão e comutação de soluções, permitiu uma elevada versatilidade, possibilitando por exemplo trabalhar com caudais diferentes e com diferentes estratégias de amostragem na determinação das duas fluorquinolonas, salientando-se também a facilidade de controlo nas determinações analíticas. O facto de a determinação da norfloxacin não implicar a presença de um reactor e a determinação da ciprofloxacina implicar a presença de um reactor de 75 cm, poderia constituir-se como uma problemática a nível da configuração analítica do sistema. Tal não aconteceu, tendo sido inclusivamente fácil realizar as determinações dos dois compostos com condições diferentes e sem uma intervenção de fundo a nível da reconfiguração física do sistema.

O elevado nível de automação, permitiu um fácil ajuste de parâmetros do sistema, químicos e físicos, contribuindo para o controlo da homogeneização e desenvolvimento reaccional.

As características únicas do sistema de fluxo multi-impulsão no que concerne à natureza de fluxo pulsado, constituiu-se como o garante de uma rápida homogeneização com implicações directas a nível da diminuição do tempo de reacção. Houve consequentemente uma redução da dispersão, com aumento da sensibilidade da determinação e com uma diminuição de consumo de amostras e reagentes como é referido concretamente mais à frente.

A metodologia proposta revelou ser uma alternativa vantajosa a considerar para a determinação de norfloxacin e ciprofloxacina em formulações farmacêuticas, especialmente se se tiver em consideração que as metodologias propostas e recomendadas pelas Farmacopeias são caracteristicamente lentas, laboriosas, requerendo muitas vezes o uso de reagentes de elevada toxicidade como por exemplo, o acetónitrilo.

Efectivamente, a metodologia desenvolvida mostrou ser rápida, apresentado um bom ritmo de amostragem (58 e 31 determinações por hora), o equipamento utilizado foi simples e de baixo custo, tendo sido os limites de detecção obtidos de 0,27 e 0,99 mg L⁻¹ para a norfloxacin e ciprofloxacina, respectivamente. A zona de resposta linear compreendeu o intervalo de concentrações de 5-70 mg L⁻¹. Para cada ciclo analítico correspondente a uma determinação de norfloxacin, foram gastos 120 µL de amostra, 120 µL de NBS e 800 µL de transportador (água), enquanto que, a uma determinação de ciprofloxacina correspondeu um gasto de 100 µL de amostra, 100 µL de NBS e 1250 µL de transportador.

Da comparação directa com os outros métodos de fluxo com determinação espectrofotométrica publicados para estas duas fluorquinolonas [1-4], verificou-se que a metodologia desenvolvida apresentava de uma maneira geral figuras de mérito melhoradas, nomeadamente no que concerne ao intervalo de concentração linear e ao ritmo de amostragem obtido. Relativamente aos trabalhos desenvolvidos em FIA [1,2], a linearidade de resposta foi obtida para uma gama de concentrações mais baixas e verificou-se uma redução em gastos de amostras e reagentes. Relativamente ao trabalho em SIA, todas as figuras de mérito apresentadas foram superiores. Uma zona linear de concentrações de 5-70 mg L⁻¹ e 120 µL / 100 µL de norfloxacin e ciprofloxacina gastos no trabalho desenvolvido, em contraste com a gama de concentrações lineares de 50-400 mg L⁻¹ e 50-500 mg L⁻¹ (norfloxacin e ciprofloxacina) e os 168 µL de amostra gastos no sistema SIA. Relativamente ao trabalho em SPS-FIA, foi obtido um melhor ritmo de amostragem (31 h⁻¹ vs. 16 h⁻¹).

A metodologia analítica poderá ser estendida à determinação de outros tipos de amostras, nomeadamente alimentares e ambientais, desde que verificado se o limite de detecção é adequado e desde que associado a um processo extractivo eficaz.

6.1. Referências Bibliográficas

- [1] SULTAN, S. ; SULIMAN, F. – Flow injection spectrophotometric determination of antibiotic ciprofloxacin in drug formulations. **Analyst**. 117 (1992) 1523-1526.
- [2] SULTAN, S. ; SULIMAN, F – Chemometric optimization and flow-injection method for the determination of norfloxacin in drug formulations. **Analyst**. 118 (1993) 573-576.
- [3] SULIMAN, F. ; SULTAN, S. – Sequential injection technique employed for stoichiometric studies, optimization and quantitative determination of some fluoroquinolone antibiotics complexed with iron III in sulphuric acid media. **Talanta**. 43 (1996) 559-568.
- [4] PASCUAL-REGUERA, M. ; PARRAS, G. ; DÍAS, A. – A single spectroscopic flow-through sensing device for determination of ciprofloxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 35 (2004) 689-695.